

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392980** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.22

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К TSLP И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/178,938

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.23

Чжан Хао, Полозова Алла,

(33) US

Фитцпатрик Келли, Абрамс Кристин,

(86) PCT/US2022/025994

Сян Донг, Жубер Мариса (US)

(87) WO 2022/226339 2022.10.27

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) Изобретение в целом относится к композициям, содержащим антитело к TSLP, представляющее собой тезепелумаб, и его производные, характеризующиеся качественными признаками антитела.

202392980

A1

A1

202392980

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579533EA/022

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К TSLP И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 63/178938, поданной 23 апреля 2021 года, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

[2] Настоящая заявка в целом относится к композициям, содержащим антитело к TSLP, представляющее собой тезепелумаб, и его производные, характеризующиеся качественными признаками антитела.

Предпосылки изобретения

[3] Тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP), цитокин, происходящий из эпителиальных клеток, вырабатываемый в ответ на воздействие стимулов окружающей среды и провоспалительных стимулов, приводит к активации множества воспалительных клеток и нисходящих сигнальных путей (Soumelis et al. *Nat Immunol* 2002;3:673-80; Allakhverdi et al. *J Exp Med* 2007;204:253-8). Уровень TSLP увеличивается в дыхательных путях пациентов с астмой и коррелирует с экспрессией цитокинов Th2 и хемокинов (Shikotra et al. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:104-11 e1-9) и тяжестью заболевания (Ying et al. *J Immunol* 2005;174:8183-90; Ying et al. *J Immunol* 2008;181:2790-8). При том, что TSLP имеет центральное значение в регуляции Th2-опосредованного иммунитета, он также может играть ключевую роль в других путях воспаления и, следовательно, иметь отношение к нескольким фенотипам астмы.

[4] Тезепелумаб представляет собой моноклональное антитело (mAb), иммуноглобулин G2 (IgG2) человека, которое связывается с TSLP, предотвращая его взаимодействие с рецепторным комплексом TSLP. Следует понимать, что тезепелумаб представляет собой гетеротетрамер, содержащий две тяжелые цепи и две легкие цепи и содержащий два сайта связывания с TSLP. Исследование для подтверждения правильности концепции с участием пациентов с легкой атопической астмой продемонстрировало, что тезепелумаб ингибирует ранние и поздние астматические реакции и подавляет биомаркеры Th2-опосредованного воспаления после провокационной пробы с вдыхаемым аллергеном (Gauvreau, et al. *N Engl J Med* 2014;370:2102-10).

Сущность изобретения

[5] Мониторинг терапевтических средств на основе антител в составе с течением времени важен для определения условий хранения, которые обеспечивают снижение любого разрушения терапевтического средства и поддержание целостности продукта. В настоящем изобретении предусмотрено исследование признаков антитела к TSLP, которые могут меняться с течением времени в ходе изготовления и хранения, включая признаки, которые могут быть благоприятными или вредными в отношении

переносимости и/или активности антитела.

[6] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают изомеризованное производное, и где количество изомеризованного производного в композиции составляет менее приблизительно 30%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

[7] В различных вариантах осуществления количество изомеризованного производного в композиции составляет менее приблизительно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В различных вариантах осуществления количество изомеризованного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 13%. В различных вариантах осуществления количество изомеризованного производного в композиции составляет от приблизительно 1% до 12%, от 2% до 10% или от приблизительно 4% до 7%. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает модификацию в определяющей комплементарности области (CDR) тяжелой цепи или легкой цепи. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает изменение остатка D54 CDR тяжелой цепи в SEQ ID NO: 7 и/или остатка D49, D50 или D52 CDR легкой цепи в SEQ ID NO: 4 в переменной области либо одной, либо обеих цепей. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по D54 в количестве, составляющем менее приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по D54 в количестве, составляющем менее приблизительно 4%, 3%, 2% или 1%. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по одному или нескольким из остатков D49, D50 или D52 в SEQ ID NO: 4 в количестве, составляющем менее приблизительно 26%. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по одному или нескольким из остатков D49, D50 или D52 в SEQ ID NO: 4 в количестве, составляющем менее приблизительно 25%, 20%, 18%, 15%, 13%, 10%, 7%, 5%, 3% или 2%. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное представляет собой изоаспарагиновую кислоту (isoAsp), циклический аспартат (cAsp), сукцинимид или промежуточный продукт изомеризации. В различных вариантах осуществления изомеризованное производное представляет собой изоаспарагиновую кислоту (isoAsp) или циклический аспартат (cAsp). В различных вариантах осуществления количество

изомеризованного производного в композиции определяется посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 30% изомеризованного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 30% изомеризованного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[8] Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают дезамидированное производное, и где количество дезамидированного производного в композиции составляет менее приблизительно 15%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3, (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8. В различных вариантах осуществления количество дезамидированного производного в композиции составляет менее приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 7%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%. В различных вариантах осуществления количество дезамидированного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 13%. В различных вариантах осуществления количество дезамидированного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до 10%, от приблизительно 1% до 8%, от приблизительно 2% до 7% или от приблизительно 3% до 6%. В различных вариантах осуществления дезамидированное производное содержит дезамидированный остаток аспарагина N25/N26 в последовательности LCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 3, остаток N316 в тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13, и/или остаток N385/390 в тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13. В различных вариантах осуществления дезамидированное производное предусматривает дезамидирование по N25/N26 в количестве, составляющем менее приблизительно 3%. В различных вариантах осуществления дезамидированное производное предусматривает дезамидирование по одному или нескольким из N316 и/или N385/390 в количестве, составляющем менее

приблизительно 13%. В различных вариантах осуществления дезамидированное производное представляет собой дезамидированный аспарагин или промежуточный продукт дезамидирования. В различных вариантах осуществления количество дезамидированного производного в композиции определяется посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% дезамидированного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% дезамидированного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[9] В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают окисленное производное, и где количество окисленного производного в композиции составляет менее приблизительно 7%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3, (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

[10] В различных вариантах осуществления количество окисленного производного составляет менее приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%. В различных вариантах осуществления количество окисленного производного в композиции составляет от приблизительно 0,4% до приблизительно 7%, от приблизительно 1% до приблизительно 6%, от приблизительно 2% до приблизительно 5% или от приблизительно 0,4% до приблизительно 4%. В различных вариантах осуществления окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из остатка метионина M34 тяжелой цепи в HCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 6, или остатка M253 или M359 в константной области тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13, или остатка триптофана W52 тяжелой цепи в HCDR2, изложенной под SEQ ID NO: 7, W90 в последовательности LCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 5, или W102 в

последовательности HCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 8, в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях. В различных вариантах осуществления окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из остатков метионина тяжелой цепи M34, M253, M359 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 7%. В различных вариантах осуществления окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из остатков триптофана W52, W90 или W102 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 3%. В различных вариантах осуществления количество окисленного производного в композиции определяется посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 7% окисленного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 7% окисленного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[11] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают гликозилированное производное, и где количество гликозилированного производного в композиции составляет менее приблизительно 40%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3, (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

[12] В различных вариантах осуществления количество гликозилированного производного в композиции составляет менее приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6% или приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления количество гликозилированного производного в композиции составляет от приблизительно 1% до

приблизительно 35%, от приблизительно 3% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20%. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное предусматривает изменение гликозилирования тезепелумаба по остатку N298 в SEQ ID NO: 13 в одной или обеих тяжелых цепях. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное предусматривает афукозилирование или изменение гликозилирования тезепелумаба до структурных единиц с высоким содержанием маннозы или галактозильных структурных единиц. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит афукозилированное производное в количестве, составляющем менее приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит галактозильные структурные единицы в количестве, составляющем менее приблизительно 30%. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит структурные единицы с высоким содержанием маннозы в количестве, составляющем менее приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления количество гликозилированного производного в композиции определяется посредством способа на основе карты гликанов. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[13] Гликозилированные производные также могут быть ассоциированы с эффекторной функцией и клиренсом антитела (следует понимать, что меньший клиренс антитела может указывать на более длительный период полужизни; по существу антитело или композиция на основе антитела, характеризующиеся "меньшим клиренсом", чем эталонные антитело или композиция на основе антитела, будут пониматься как относящиеся к численно более длительному периоду полужизни, чем эталонные антитело или композиция на основе антитела). В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8% или приблизительно 6% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция,

содержащая более приблизительно 25%, приблизительно 23% (например, приблизительно 23,1%), приблизительно 21%, приблизительно 18%, приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8%, приблизительно 6% или приблизительно 5% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 23,1% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления увеличение содержания соединений с высоким содержанием маннозы с 5% до 23,1% приводит к увеличению клиренса тезепелумаба и производных тезепелумаба на не более чем на 1,7% или 10%.

[14] Также предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько его производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, где одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-B и/или изоформу IgG2-A/B, и где количество дисульфидной изоформы в композиции составляет менее приблизительно 75%. В различных вариантах осуществления количество дисульфидной изоформы в композиции составляет менее приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%.

[15] В различных вариантах осуществления одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-B. В различных вариантах осуществления количество изоформы IgG2-B составляет менее приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-A/B. В различных вариантах осуществления количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет менее приблизительно 75%. В различных вариантах осуществления количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 38% до приблизительно 43%. В различных вариантах осуществления количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции определяется посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невозстанавливающих условиях.

[16] Также рассматривается композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба представляют собой высокомолекулярные (HMW) соединения, и где количество HMW соединений в композиции составляет менее приблизительно 20%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3, (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную

последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

[17] В различных вариантах осуществления HMW соединения в композиции составляют менее приблизительно 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В различных вариантах осуществления количество HMW соединений в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 13%, от приблизительно 1% до приблизительно 11%, от приблизительно 2% до приблизительно 10%, или от приблизительно 3% до приблизительно 8%, или от приблизительно 4% до приблизительно 7%. В различных вариантах осуществления количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 1,7% или меньше. В различных вариантах осуществления количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 1,4% или меньше. В различных вариантах осуществления HMW соединения предусматривают димер тезепелумаба.

[18] В различных вариантах осуществления количество HMW соединений в композиции определяется посредством эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC), ультрацентрифугирования со скоростной седиментацией (SV-AUC) или капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS). В различных вариантах осуществления SE-HPLC представляет собой SE-ультра-HPLC (SE-UHPLC) или SE-HPLC со статическим светорассеянием (SE-HPLC-SLS). В различных вариантах осуществления SE-HPLC представляет собой SE-UHPLC. В различных вариантах осуществления, когда SE-HPLC представляет собой SE-UHPLC, белки разделяются в изократическом режиме с применением подвижной фазы, содержащей 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, при значении pH, составляющем 6,8. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% HMW соединений, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% HMW соединений, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[19] В различных вариантах осуществления композиции (a) тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных

производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR, или (b) тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более 15% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом, чем композиция, содержащая более 15% структурных единиц с высоким содержанием маннозы.

[20] В различных вариантах осуществления композиции (a) тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR, или (b) тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более 25% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом, чем композиция, содержащая более 25% структурных единиц с высоким содержанием маннозы.

[21] Кроме того, предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают фрагмент тезепелумаба, и где количество фрагмента тезепелумаба в композиции составляет менее приблизительно 15%, где тезепелумаб содержит (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3, (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

[22] В различных вариантах осуществления количество фрагментов в композиции составляет менее приблизительно 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В различных вариантах осуществления количество фрагментов в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 13%, от приблизительно 1% до приблизительно 11%, от приблизительно 2% до приблизительно 10%, или от приблизительно 3% до приблизительно 8%, или от приблизительно 4% до приблизительно 7%. В различных вариантах осуществления фрагменты тезепелумаба представляют собой низкомолекулярные (LMW) или среднемолекулярные (MMM) соединения или их

комбинации. В различных вариантах осуществления фрагменты представляют собой низкомолекулярные соединения с весом, составляющим менее приблизительно 25 кДа. В различных вариантах осуществления фрагменты представляют собой средномолекулярные соединения, характеризующиеся молекулярным весом, составляющим от приблизительно 25 кДа до 50 кДа. В различных вариантах осуществления количество фрагмента тезепелумаба в композиции определяется посредством капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS). В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% фрагментов тезепелумаба, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% фрагментов тезепелумаба, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[23] В данном документе предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где производные тезепелумаба предусматривают изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, гликозилированные производные, HMW соединения, фрагменты, дисульфидные изомеры или их комбинации, где композиция обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (a) количество изомеризованных производных в композиции составляет приблизительно 30% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях; (b) количество дезамидированных производных в композиции составляет приблизительно 15% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования; (c) количество окисленных производных в композиции составляет приблизительно 7% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях; (d) количество гликозилированных производных в композиции составляет приблизительно 75% или меньше, как измерено посредством картирования гликанов; (e) количество дисульфидных изомеров в композиции составляет приблизительно 40% или меньше, как измерено посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невозстанавливающих условиях (RP-HPLC); (f) количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 20% или меньше, как измерено посредством SE-HPLC, и/или (g) количество фрагментов в композиции составляет приблизительно 20% или меньше, как измерено посредством rCE-SDS.

[24] В различных вариантах осуществления тезепелумаб содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, и аминокислотную

последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 12.

[25] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ оценки качества композиции на основе тезепелумаба, включающий получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба; измерение количества одного или нескольких производных тезепелумаба в композиции, где производные тезепелумаба предусматривают изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, гликозилированные варианты, производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, HMW соединения, фрагменты или их комбинации; сравнение измеренного количества одного или нескольких производных тезепелумаба с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. В различных вариантах осуществления измеряют количество изомеризованных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 30% или меньше. В различных вариантах осуществления величину изомеризации в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления измеряют количество дезамидированных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 15% или меньше. В различных вариантах осуществления величину дезамидирования в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления измеряют количество окисленных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 7% или меньше. В различных вариантах осуществления величину окисления в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления измеряют количество гликозилированных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 40% или меньше. В различных вариантах осуществления величину гликозилирования в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством картирования гликанов. В различных вариантах осуществления измеряют количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 75% или меньше. В различных вариантах осуществления количество дисульфидных изоформ в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях. В различных вариантах осуществления измеряют количество HMW соединений, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 20% или меньше. В различных вариантах осуществления количество HMW соединений измеряют посредством SE-HPLC. В различных вариантах

осуществления измеряют количество фрагментов, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 15% или меньше. В различных вариантах осуществления количество фрагментов в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством rCE-SDS.

[26] В различных вариантах осуществления композицию на основе тезепелумаба получают из линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), которая экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь под SEQ ID NO: 10, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь под SEQ ID NO: 12.

[27] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой человеческое антитело. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления тезепелумаб или его производное специфически связывается с полипептидом TSLP, представленным аминокислотами 29-159 в SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления оба сайта связывания тезепелумаба или его производного характеризуются идентичным связыванием с TSLP.

[28] В различных вариантах осуществления тезепелумаб или его производное связывает TSLP с аффинностью, которая соответствует K_d , численно составляющей не более 10^{-8} M.

[29] Дополнительно рассматривается композиция, содержащая тезепелумаб или его производные, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

[30] В настоящем изобретении также предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен легкой цепи, переменный домен тяжелой цепи или оба тезепелумаба или его производного, описанных в данном документе.

[31] В настоящем изобретении дополнительно рассматривается рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую тезепелумаб, как описано в данном документе. Также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии.

[32] Дополнительно в данном документе рассматривается способ получения композиции, содержащей тезепелумаб или его производные, которая специфически связывается с полипептидом TSLP, содержащим аминокислоты 29-159 в SEQ ID NO: 2, включающий инкубирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют ей экспрессировать иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или антитело, где указанная клетка-хозяин содержит (i) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен легкой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, и рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, или (ii) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как переменный домен легкой цепи, так и переменный домен тяжелой цепи тезепелумаба.

[33] В данном документе также предусмотрен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей тезепелумаб и его производные. В различных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF). В различных вариантах осуществления астма представляет собой легкую, умеренную или тяжелую астму. В различных вариантах осуществления астма представляет собой тяжелую астму. В различных вариантах осуществления астма представляет собой эозинофильную или неэозинофильную астму.

[34] В различных вариантах осуществления способ включает введение композиции с интервалом каждые 2 недели или каждые 4 недели. В различных вариантах осуществления композицию вводят в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год или больше.

[35] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления тезепелумаб или производные тезепелумаба содержат переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 12, и характеризуются одним или несколькими признаками, описанными в данном документе.

[36] В НАСТОЯЩЕМ ИЗОБРЕТЕНИИ ТАКЖЕ ПРЕДУСМОТРЕНА КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ТЕЗЕПЕЛУМАБ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ, ОПИСАННЫЕ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ. В ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТАХ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ В НАСТОЯЩЕМ ИЗОБРЕТЕНИИ ПРЕДУСМОТРЕНО ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ТЕЗЕПЕЛУМАБ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ, ОПИСАННЫЕ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ, В ПОЛУЧЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ.

[37] Также рассматриваются шприцы, например, одноразовые или предварительно заполненные шприцы, стерильные герметично закрытые контейнеры, например, флаконы, бутыл, сосуд, и/или наборы или упаковки, содержащие любые из вышеприведенных антител или композиций, необязательно с подходящими инструкциями по применению. В различных вариантах осуществления введение осуществляют посредством предварительно заполненного шприца или автоинъектора. В различных вариантах осуществления автоинъектор представляет собой устройство Ypsomed YpsoMate®.

[38] Понятно, что каждый признак, или вариант осуществления, или комбинация, описанные в данном документе, представляют собой неограничивающий иллюстративный пример любого из аспектов настоящего изобретения, и, следовательно, предполагается,

что они могут использоваться в комбинации с любым другим признаком, или вариантом осуществления, или комбинацией, описанными в данном документе. Например, если признаки описаны с помощью таких формулировок, как "один вариант осуществления", "некоторые варианты осуществления", "определенные варианты осуществления", "дополнительный вариант осуществления", "конкретные иллюстративные варианты осуществления" и/или "другой вариант осуществления", каждый из данных типов вариантов осуществления представляет собой неограничивающий пример признака, который предполагается для использования в комбинации с любым другим признаком или комбинацией признаков, описанными в данном документе, без необходимости перечисления каждой возможной комбинации. Такие признаки или комбинации признаков применимы к любому из аспектов настоящего изобретения. В случаях, где раскрываются примеры значений, находящихся в пределах диапазонов, любые из данных примеров рассматриваются как возможные конечные точки диапазона, рассматриваются все без исключения числовые значения между такими конечными точками, и предусматриваются все без исключения комбинации верхних и нижних конечных точек.

[39] Заголовки в данном документе предназначены для удобства читателя и не предназначены для ограничения. Дополнительные аспекты, варианты осуществления и видоизменения настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания, и/или графических материалов, и/или формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

[40] **Фигуры 1A - 1F** представляют собой серию графиков соотношения влияния, изображающих взаимосвязь между активностью и общим IsoAsp CDR (фигуры 1A и 1D), NMW соединениями (фигуры 1B и 1E) и общим окислением Trp CDR (фигуры 1C и 1F).

Подробное описание

[41] Структуру тезепелумаба выяснили с помощью ряда биологических, биохимических и биофизических методик для обеспечения понимания его структуры и функциональных свойств и оценки критических показателей качества.

[42] Если не указано иное, то следующие термины, применяемые в настоящей заявке, включая описание и формулу изобретения, имеют определения, представленные ниже.

[43] Как применяется в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного и множественного числа включают определяемые объекты как во множественном, так и в единственном числе, если контекст явно не указывает на иное.

[44] Если не указано иное, то все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[45] Термины "приблизительно" или "примерно" означают допустимую погрешность для конкретного значения, определенного специалистом средней квалификации в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется. В определенных вариантах осуществления термин

"приблизительно" или "примерно" означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений. В определенных вариантах осуществления термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,05% от указанного значения или диапазона. Всякий раз, когда термин "приблизительно" или "примерно" предшествует первому числовому значению в ряду из двух или более числовых значений, подразумевается, что термин "приблизительно" или "примерно" применим к каждому из числовых значений в данном ряду.

[46] Термин "воспалительное заболевание" относится к медицинскому состоянию, предусматривающему аномальное воспаление, вызванное атакой иммунной системы на собственные клетки или ткани организма, что может приводить к хронической боли, покраснению, отеку, скованности и повреждению нормальных тканей. Воспалительные заболевания включают, например, астму, хроническую пептическую язву, туберкулез, периодонтит, синусит, активный гепатит, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), болезнь Крона, язвенный колит, остеоартрит, атеросклероз, системную красную волчанку, атопический дерматит, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), назальные полипы, хроническую спонтанную крапивницу, заболевание, обусловленное Ig (такое как IgA-нефропатия и волчаночный нефрит), эозинофильный гастрит, хронический синусит без назальных полипов, идиопатический легочный фиброз (IPF) и т. п. В иллюстративных аспектах воспалительное заболевание представляет собой астму, атопический дерматит или COPD. В иллюстративных аспектах воспалительное заболевание представляет собой астму, и в некоторых случаях астма представляет собой тяжелую астму, эозинофильную астму, неэозинофильную астму или астму с низким уровнем эозинофилов.

[47] Применяемый в данном документе термин "астма" относится к аллергической, неаллергической, эозинофильной и неэозинофильной астме.

[48] Термин "аллергическая астма", применяемый в данном документе, относится к астме, которая вызывается одним или несколькими вдыхаемыми аллергенами. Такие пациенты характеризуются положительным уровнем IgE согласно флуоресцентному иммуноферментному анализу (FEIA) в отношении одного или нескольких аллергенов, которые вызывают астматическую реакцию. Как правило в большинстве случаев аллергическая астма ассоциирована с воспалением Th2-типа.

[49] Термин "неаллергическая астма" относится к пациентам, которые характеризуются низким уровнем эозинофилов, низким уровнем Th2 или низким уровнем IgE на момент постановки диагноза. Пациент, у которого имеется "неаллергическая астма", как правило, характеризуется отрицательным результатом в отношении IgE согласно флуоресцентному иммуноферментному анализу (FEIA) в ответ на панель аллергенов, включающую регионально-специфические аллергены. В дополнение к низкому уровню IgE эти пациенты часто характеризуются низкими количествами эозинофилов или их отсутствием, а также низкими количествами Th2 на момент постановки диагноза.

[50] Термин "тяжелая астма", применяемый в данном документе, относится к астме, которая требует высокоинтенсивного лечения (например, шага 4 и шага 5 согласно GINA) для поддержания надлежащего контроля, или в тех случаях, когда надлежащий контроль не достигается, несмотря на высокоинтенсивное лечение (GINA, Глобальная стратегия контроля и предупреждения бронхиальной астмы. Глобальная инициатива по бронхиальной астме (GINA), декабрь 2012 года).

[51] Термин "эозинофильная астма", применяемый в данном документе, относится к пациенту с астмой, у которого при скрининге количество эозинофилов в крови меньше или равняется 300 клеток/мкл или меньше или равняется 250 клеток/мкл. Астма "с низким уровнем эозинофилов" относится к пациентам с астмой, у которых имеется менее 250 клеток/мкл крови или сыворотки крови. В качестве альтернативы астма с "низким уровнем эозинофилов" относится к пациентам с астмой, у которых имеется менее 300 клеток/мкл крови или сыворотки крови.

[52] "Цитокин, продуцируемый Т-хелперами (Th) 1" или "Th1-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th1, и включают IFN-g, TNF-a и IL-12. "Цитокин Th2" или "Th2-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th2, включая IL-4, IL-5, IL-13 и IL-10. "Цитокин Th17" или "Th17-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th17, включая IL-17A, IL-17F, IL-22 и IL-21. Определенные популяции клеток Th17 экспрессируют IFN-g и/или IL-2 в дополнение к цитокинам Th17, перечисленным в данном документе. Полифункциональный цитокин CTL включает IFN-g, TNF-a, IL-2 и IL-17.

[53] Термины "специфически связывает", "антигенспецифический", "специфический в отношении", "селективное связывающее средство", "специфическое связывающее средство", "антиген-мишень" или "иммунореактивный" в отношении антигена относятся к антителу или полипептиду, которые связывают антиген-мишень с большей аффинностью, чем другие антигены со сходной последовательностью. В данном документе предполагается, что средство специфически связывает белки-мишени, применимые в выявлении типов иммунных клеток, например, поверхностный антиген (например, Т-клеточный рецептор, CD3), цитокин (например, TSLP, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IFN-g, TNF-a) и т. п. В различных вариантах осуществления антитело специфически связывает целевой антиген, но может вступать в перекрестную реакцию с ортологом близкородственного вида, например, антитело может связывать белок человека, а также связывать белок близкородственного примата. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, специфические в отношении TSLP, связываются с Kd, численно меньшей или равной 10^{-8} М. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP, описанное в данном документе, связывается с аффинностью (Kd), составляющей по меньшей мере 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или меньше.

[54] Термин "антитело" относится к тетрамерному гликопротеину, который состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых содержит вариабельную область и константную область. "Тяжелые цепи" и "легкие цепи" относятся к по сути полноразмерным каноническим легким и тяжелым цепям иммуноглобулинов (см., например, Immunobiology, 5th Edition (Janeway and Travers et al., Eds., 2001). Антигенсвязывающие части могут быть получены посредством методик рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител.

[55] Антигенсвязывающие белки включают антитела, фрагменты антител и антителоподобные белки, которые могут иметь структурные изменения в структуре канонических тетрамерных антител. "Варианты" антител относятся к антигенсвязывающим белкам или их фрагментам, которые могут иметь структурные изменения в последовательности или функции антитела по сравнению с исходным антителом, имеющим известную последовательность. Варианты антител содержат V-области с изменением константных областей или в качестве альтернативы предусматривают добавление V-областей к константным областям, необязательно неканоническим образом. Примеры включают полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела с дополнительными V-областями), фрагменты антител, которые способны связывать антиген (например, Fab', F'(ab)₂, F_v, одноцепочечные антитела, диатела), бипаратопные и рекомбинантные пептиды, содержащие вышеприведенное, при условии, что они характеризуются желаемой биологической активностью.

[56] Фрагменты антител включают антигенсвязывающие части антител, включая, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, доменное антитело (dAb), фрагменты определяющих комплементарность областей (CDR), антигенсвязывающие области с привитыми CDR, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, минитело, линейное антитело; хелатирующее рекомбинантное антитело, триспецифическое антитело или биспецифическое антитело, интратело, нанотело, малое модульное иммунофармацевтическое средство (SMIP), слитый белок на основе антигенсвязывающего домена иммуноглобулина, однодоменные антитела (включая камелизированное антитело), антитело, содержащее V_{HH}, или его вариант или производное и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для обеспечения специфичного связывания антигена с полипептидом, как, например, одну, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, при условии, что антитело сохраняет желаемую биологическую активность.

[57] Применяемый в данном документе термин "производное антитела" относится к антителам, антигенсвязывающим белкам или их фрагментам, обладающими одним или несколькими описанными в данном документе признаками, которые могут быть охарактеризованы с точки зрения их химической идентичности, химической модификации

или типа структурного признака (например, HMW соединение, фрагмент или изоформа) и проявляют желаемую биологическую активность.

[58] "Валентность" относится к количеству антигенсвязывающих сайтов в каждом антителе или фрагменте антитела, которые нацеливаются на эпитоп. Типичная полноразмерная молекула IgG или F(ab)₂ является "бивалентной" в том смысле, что она содержит два идентичных сайта связывания мишени. Фрагмент "моновалентного" антитела, такой как F(ab)' или scFc, с одним антигенсвязывающим сайтом. Тривалентные или тетравалентные антигенсвязывающие белки также могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были поливалентными.

[59] "Моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

[60] Термин "ингибирует активность TSLP" включает ингибирование любого одного или нескольких из следующего: связывания TSLP с его рецептором; пролиферации, активации или дифференцировки клеток, экспрессирующих TSLPR, в присутствии TSLP; ингибирования продуцирования цитокинов Th2 в поляризационном анализе в присутствии TSLP; активации или созревания дендритных клеток в присутствии TSLP и высвобождения цитокинов тучными клетками в присутствии TSLP. См., например, патент США 7982016 B2, столбец 6 и пример 8, и US 2012/0020988 A1, примеры 7-10.

[61] Термин "образец" или "биологический образец" относится к пробе, полученной от субъекта для применения в способах по настоящему изобретению, и включает мочу, цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, слюну, мокроту, биоптаты тканей, спинномозговую жидкость, мононуклеарные клетки периферической крови со стимуляцией *in vitro*, мононуклеарные клетки периферической крови без стимуляции *in vitro*, лимфоидные ткани кишечника со стимуляцией *in vitro*, лимфоидные ткани кишечника без стимуляции *in vitro*, жидкость кишечного лаважа, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, жидкость назального лаважа и индуцированную мокроту.

[62] Термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к устранению, ослаблению, подавлению или уменьшению интенсивности проявлений, временно либо постоянно, частично либо полностью, клинического симптома, проявления или прогрессирования явления, заболевания или состояния, ассоциированного с воспалительным нарушением, описанным в данном документе. Как признается в соответствующей области техники, лекарственные средства, используемые в качестве терапевтических средств, могут снижать тяжесть указанного болезненного состояния, но не обязательно должны устранять каждое проявление заболевания, чтобы считаться применимыми терапевтическими средствами. Сходным образом, введенное в целях профилактики средство лечения не обязательно должно быть полностью эффективным в предупреждении возникновения состояния, чтобы представлять собой действенное

профилактическое средство. Простое снижение воздействия заболевания (например, путем снижения числа или тяжести его симптомов, или путем увеличения эффективности другого лечения, или путем достижения другого благоприятного эффекта) или снижение вероятности того, что заболевание возникнет или ухудшится у субъекта, является достаточным. Один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на способ определения эффективности лечения, включающий введение пациенту терапевтического средства в количестве и в течение периода времени, достаточных для того, чтобы индуцировать устойчивое улучшение по сравнению с исходным уровнем показателя, который отражает тяжесть конкретного нарушения.

[63] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, которое является эффективным для уменьшения интенсивности проявлений или облегчения симптомов или признаков заболевания, ассоциированных с заболеванием или нарушением.

TSLP

[64] Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) представляет собой цитокин из эпителиальных клеток, который продуцируется в ответ на провоспалительные стимулы и запускает аллергические воспалительные реакции, главным образом посредством своей активности в отношении дендритных клеток (Gilliet, *J Exp Med.* 197:1059-1067, 2003; Soumelis, *Nat Immunol.* 3:673-680, 2002; Reche, *J Immunol.* 167:336-343, 2001), тучных клеток (Allakhverdi, *J Exp Med.* 204:253-258, 2007) и CD34+ клеток-предшественников (Swedin et al. *Pharmacol Ther* 2017;169:13-34). TSLP передает сигнал посредством гетеродимерного рецептора, состоящего из альфа-цепи рецептора интерлейкина (IL)-7 (IL-7R α) и рецептора, подобного общей γ -цепи (TSLPR) (Pandey, *Nat Immunol.* 1:59-64, 2000; Park, *J Exp Med.* 192:659-669, 2000).

[65] Уровни мРНК TSLP человека (Brightling et al., *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:5-10; quiz 1-2; Ortega et al. *N Engl J Med* 2014;371:1198-207) и белка TSLP человека (Ortega et al., выше) увеличены в дыхательных путях индивидуумов с астмой по сравнению с контролями, и величина этой экспрессии коррелирует с тяжестью заболевания (Brightling et al., выше). Недавние исследования продемонстрировали связь однонуклеотидного полиморфизма в локусе TSLP человека с защитой от астмы, atopической астмы и гиперреактивности дыхательных путей, что позволяет предположить, что дифференциальная регуляция экспрессии гена TSLP может оказывать влияние на восприимчивость к заболеванию (Ortega et al. *N Engl J Med* 2014;371:1198-207; To et al. *BMC Public Health* 2012;12:204). Эти данные позволяют предположить, что нацеливание на TSLP может ингибировать несколько биологических сигнальных путей, вовлеченных в развитие астмы.

[66] Более ранние неклинические исследования TSLP позволяли предположить, что после высвобождения TSLP из эпителиальных клеток или стромальных клеток дыхательных путей он активирует тучные клетки, дендритные клетки и Т-клетки с высвобождением ими цитокинов Th2 (например, IL-4/13/5). Недавно опубликованные

данные, полученные с участием людей, продемонстрировали хорошую корреляцию между экспрессией гена и белка TSLP в тканях, баллом сигнатуры генов Th2 и уровнем эозинофилов в тканях при тяжелой астме. Следовательно, нацеливающееся средство терапии на основе антитела к TSLP может быть эффективным у пациентов с астмой и воспалением Th2-типа (Shikotra et al., *J Allergy Clin Immunol.* 129(1):104-11, 2012).

[67] Данные из других исследований позволяют предположить, что TSLP может способствовать воспалению дыхательных путей посредством Th2-независимых сигнальных путей, таких как взаимодействие между гладкомышечными и тучными клетками дыхательных путей (Allakhverdi et al., *J Allergy Clin Immunol.* 123(4):958-60, 2009; Shikotra et al., выше). TSLP также может способствовать индуцированию дифференцировки Т-клеток в клетки, продуцирующие цитокины Th17, в результате чего происходит усиление нейтрофильного воспаления, обычно наблюдаемого при более тяжелой астме (Tanaka et al., *Clin Exp Allergy.* 39(1):89-100, 2009). Эти данные и другие появляющиеся свидетельства позволяют предположить, что блокирование TSLP может служить для подавления нескольких биологических сигнальных путей, включая без ограничения те, в которых участвуют цитокины Th2 (IL-4/13/5).

Антитела

[68] Предполагается, что антитела или производные антител или антигенсвязывающие белки, специфические в отношении TSLP, являются применимыми в лечении воспалительных заболеваний, включая астму, такую как тяжелая форма астмы, эозинофильная астма, неэозинофильная/астма с низким уровнем эозинофилов и другие формы астмы, описанные в данном документе, атопический дерматит, ЕоЕ и COPD.

[69] Специфические связывающие средства, такие как антитела и производные или фрагменты антител, которые связываются с их целевым антигеном, например, TSLP, являются применимыми в способах и композициях по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления специфическое связывающее средство представляет собой антитело. Антитела могут представлять собой моноклональные (MAb); рекомбинантные; химерные; гуманизированные, такие как антитела с привитыми определяющими комплементарность областями (CDR); человеческие; варианты антител, включая одноцепочечные и/или биспецифические, а также фрагменты; варианты или их производные. Фрагменты антител содержат те части антитела, которые связываются с эпитопом на представляющем интерес полипептиде. Примеры таких фрагментов включают Fab- и F(ab')-фрагменты, полученные посредством ферментативного расщепления полноразмерных антител. Другие связывающие фрагменты предусматривают фрагменты, полученные посредством методик рекомбинантной ДНК, таких как экспрессия рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области антител.

[70] Моноклональные антитела могут быть модифицированы для применения в качестве терапевтических средств или диагностических средств. Один вариант осуществления представляет собой "химерное" антитело, в котором часть тяжелой (H)

и/или легкой (L) цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная(остальные) часть(части) цепи(цепей) идентична(идентичны) или гомологична(гомологичны) соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Также включены фрагменты таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. См. патент США № 4816567; Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55.

[71] В другом варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой "гуманизированное" антитело. Способы гуманизации антител, отличных от человеческих, хорошо известны из уровня техники. См. патенты США № 5585089 и № 5693762. Обычно гуманизированное антитело содержит один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который является отличным от человеческого. Гуманизацию можно осуществлять, например, с применением способов, описанных в данной области техники (Jones et al., 1986, Nature 321:522-25; Riechmann et al., 1998, Nature 332:323-27; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-36), посредством замены по меньшей мере части определяющей комплементарность области грызуна на соответствующие области человеческого антитела.

[72] Настоящее изобретение также охватывает варианты и производные человеческих антител (включая фрагменты антител), которые связывают TSLP. С применением трансгенных животных (например, мышей), которые способны вырабатывать репертуар человеческих антител в отсутствие выработки эндогенных иммуноглобулинов, такие антитела получают посредством иммунизации полипептидным антигеном (т. е. содержащим по меньшей мере 6 смежных аминокислот), необязательно конъюгированным с носителем. См., например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-58; Bruggermann et al., 1993, Year in Immuno. 7:33. См. также заявки согласно PCT №№ PCT/US96/05928 и PCT/US93/06926. Дополнительные способы описаны в патенте США № 5545807, заявках согласно PCT №№ PCT/US91/245 и PCT/GB89/01207, а также в европейских патентах №№ 546073B1 и 546073A1. Человеческие антитела также могут быть получены посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или посредством экспрессии в гибридных клетках, как описано в данном документе.

[73] Химерные, CDR-привитые и гуманизированные антитела, фрагменты антител и/или варианты и производные антител как правило получают рекомбинантными способами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вводят в клетки-хозяева и экспрессируют с применением материалов и процедур, описанных в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления антитела получают в клетках-хозяевах млекопитающих, таких как клетки CHO. Моноклональные (например, человеческие) антитела могут быть получены посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или посредством экспрессии в гибридных клетках, как описано в данном

документе. Дополнительные примеры клеток млекопитающих включают иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния), включая, в дополнение к клеткам яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьян (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2) и эпителиальные клетки 293 почки человека. Кроме того, можно выбрать клеточные линии или системы-хозяева таким образом, чтобы гарантировать надлежащую модификацию и процессинг тезепелумаба или производных тезепелумаба. Можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. К ним относятся клетки CHO, VERY, ВНК, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток мышинной миеломы, которая не продуцирует эндогенно какие-либо функциональные цепи иммуноглобулина), SP20, CRL7030 и HsS78Bst. Также можно применять линии клеток человека, полученные посредством иммортализации лимфоцитов человека. Для рекомбинантного получения моноклональных антител также можно применять линию клеток человека PER.C6® (Janssen; Титусвилл, Нью-Джерси).

[74] В качестве примера тезепелумаб и производные тезепелумаба, характеризующиеся молекулярными признаками, описанными в данном документе, могут быть получены посредством отбора клеточного клона, который экспрессирует тезепелумаб или производное тезепелумаба, характеризующиеся данными молекулярными признаками. Для получения такого тезепелумаба или производных тезепелумаба можно применять способы на основе рекомбинантной ДНК. Например, ДНК, кодирующая тяжелую цепь и легкую цепь тезепелумаба или производных тезепелумаба, может быть встроена в подходящий вектор экспрессии (или векторы, например, один вектор для тяжелой цепи и один для легкой цепи), который можно трансфицировать в подходящую клетку-хозяина, такую как клетка линии клеток млекопитающего. Подходящие векторы экспрессии известны из уровня техники, содержащие, например, полинуклеотид, который кодирует полипептид тезепелумаба, соединенный с промотором. Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина посредством общепринятых методик, и трансфицированные клетки можно культивировать для получения антител. Необязательно клетки-хозяева могут быть сконструированы для модулирования молекулярных признаков. Например, для модулирования фукозилирования компетентные в отношении гликозилирования клетки можно генетически модифицировать для изменения активности фукозилтрансферазы или транспортера GDP-фукозы аппарата Гольджи. В качестве примера конструирование линии клеток для модулирования гликозилирования описано в публикации согласно РСТ № WO 2015/116315.

[75] Могут быть отобраны клоны, продуцирующие тезепелумаб или производные тезепелумаба, обладающие соответствующими молекулярными признаками. В качестве

примера, можно использовать общепризнанный способ получения и выращивания клонов на основе планшетов для микротитрования. Сотни объединенных гетерогенных клеток можно сортировать по одноклеточным культурам посредством таких способов, как сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или предельное разведение. После обеспечения выделения здоровых и стабильных популяций эти полученные клональным способом клетки можно проанализировать и отдельные популяции выбрать для дальнейшего анализа. Для дальнейшего анализа клетки клонов можно культивировать в небольших контейнерах, таких как центрифужные пробирки, 24-луночные планшеты или 96-луночные планшеты с глубокими лунками, которые культивируют в условиях "мелкомасштабной клеточной культуры" (например, 10-дневный периодический процесс с подпиткой). В ходе этого мелкомасштабного процесса периодически добавляют бульоны питательных веществ и получают разные показатели роста и жизнеспособности клеток. Сотни или даже тысячи этих мелкомасштабных культур могут существовать параллельно. По окончании культивирования (например, на десятый день) клетки собирают для оценки и анализа. Необязательно способ получения и выращивания клонов на основе планшетов для микротитрования (например, субклонирование) можно заместить применением автоматизированного или частично автоматизированного инструмента для высокопроизводительного и одновременного многопараметрического анализа, такого как, например, оптоэлектронная система получения и анализа линий клеток Berkeley Lights Veacon™. Необязательно можно применять способы одновременного многопараметрического анализа и инструменты машинного обучения для ускорения отбора клонов, обладающих соответствующими молекулярными признаками (см., например, публикацию согласно РСТ № WO 2020/223422).

[76] Антитело к TSLP, представляющее собой тезепелумаб, описано в патенте США № 7982016 и заявке на патент США № 15/951602.

[77] Антигенсвязывающий белок к TSLP (включая его фрагменты), применимый в настоящих способах, предусматривает антитело к TSLP, содержащее а. переменный домен легкой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4; iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, и б. переменный домен тяжелой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, и iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, где антитело или производное антитела специфически связывается с полипептидом TSLP, как изложено в аминокислотах 29-159 в последовательности под SEQ ID NO: 2.

[78] Также рассматривается антитело или производное антитела, содержащее а.

вариабельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, на по меньшей мере 80% идентичной последовательности под SEQ ID NO: 12; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 11; iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с комплементарным полинуклеотидом, состоящим из последовательности под SEQ ID NO: 11, и b. вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 10; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 9; iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизуется в умеренно жестких условиях с комплементарным полинуклеотидом, состоящим из последовательности под SEQ ID NO: 9, или c. вариабельный домен легкой цепи (a) и вариабельный домен тяжелой цепи (b), где антитело или производное антитела специфически связываются с полипептидом TSLP, как изложено в аминокислотах 29-159 в последовательности под SEQ ID NO: 2.

[79] Тезепелумаб представляет собой иллюстративное антитело к TSLP, содержащее: a. i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4; iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, и b. вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, и iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8.

[80] Тезепелумаб также содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12; кодируемую полинуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 11, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 9.

[81] В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или его производное антитела являются бивалентными и выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, одноцепочечного антитела, мономерного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[82] В различных вариантах осуществления производное антитела к TSLP выбрано

из группы, состоящей из диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, однодоменного антитела, scFv, где дозу корректируют таким образом, чтобы сайты связывания были эквимоларны сайтам во вводимых дозах бивалентных антител.

[83] Предполагается, что антитело или производное антитела представляют собой антитело IgG2. Иллюстративные последовательности константной области IgG2 человека, доступные в базе данных Uniprot под номером Uniprot P01859, включены в данный документ посредством ссылки. Информация, включая информацию о последовательностях других константных областей тяжелой и легкой цепей антител, также общедоступна в базе данных Uniprot, а также в других базах данных, хорошо известных специалистам в области конструирования и получения антител. Тезепелумаб представляет собой антитело IgG2. Последовательности полноразмерных тяжелой цепи и легкой цепи тезепелумаба, включая цепь IgG2, изложены под SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.

[84] В определенных вариантах осуществления производные антител включают тетрамерные гликозилированные антитела, где число и/или тип сайта гликозилирования были изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В определенных вариантах осуществления варианты содержат большее или меньшее число сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. В качестве альтернативы, замены, которые обеспечивают устранение этой последовательности, будут обеспечивать удаление существующей N-связанной углеводной цепи. Также предусмотрена перегруппировка N-связанных углеводных цепей, где один или несколько сайтов N-связанного гликозилирования (как правило, тех, которые встречаются в природе) устраняются и создаются один или несколько новых сайтов N-связанного гликозилирования. Дополнительные варианты антител включают цистеиновые варианты, где один или несколько остатков цистеина удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть применимы, если антитела должны подвергаться повторному фолдингу в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Обычно цистеиновые варианты содержат меньше остатков цистеина, чем нативный белок, и, как правило, содержат четное число, чтобы свести к минимуму взаимодействия, обусловленные неспаренными остатками цистеина.

[85] Желаемые аминокислотные замены (либо консервативные, либо неконсервативные) могут быть определены специалистами в данной области техники тогда, когда такие замены желаемы. В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены можно применять для выявления важных остатков антител к TSLP человека или для увеличения или уменьшения аффинности описанных в данном документе антител к TSLP человека.

[86] Согласно определенным вариантам осуществления предпочтительными аминокислотными заменами являются замены, которые: (1) обеспечивают снижение

восприимчивости к протеолизу, (2) обеспечивают снижение восприимчивости к окислению, (3) обеспечивают изменение аффинности связывания/значений аффинности связывания, (4) обеспечивают ингибирование образования высокомолекулярных (HMW) соединений и/или (5) придают другие физико-химические или функциональные свойства таким полипептидам или модифицируют их. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько аминокислотных замен (в определенных вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены) могут быть осуществлены во встречающейся в природе последовательности (в определенных вариантах осуществления в части полипептида за пределами домена(доменов), образующего(образующих) межмолекулярные контакты). В определенных вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена, как правило, не может существенно изменить структурные характеристики исходной последовательности (например, заменяющая аминокислота не должна характеризоваться тенденцией к разрыву спирали, которая встречается в исходной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которые характеризуют исходную последовательность). Примеры известных из уровня техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Способы получения

[87] Композиции на основе тезепелумаба по настоящему изобретению можно получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь и легкую цепь, в клетке-хозяине, частичной очистки или очистки тезепелумаба из культур клеток-хозяев или лизатов клеток-хозяев и анализа полученных композиций в отношении одного или нескольких производных тезепелумаба, подробно описанных в данном документе, согласно способам, более подробно описанным ниже.

[88] Для рекомбинантного получения тезепелумаба или производных тезепелумаба одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь (например, полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10) и легкую цепь (например, полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12), встраивают в один или несколько векторов экспрессии. Нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, можно встраивать в один вектор экспрессии, или их можно встраивать в отдельные векторы экспрессии. Применяемый в данном документе термин "вектор экспрессии" или "конструкция для экспрессии" относится к рекомбинантной молекуле ДНК, содержащей желаемую кодирующую последовательность и соответствующие регуляторные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Вектор экспрессии может включать последовательности, которые

оказывают влияние на транскрипцию, трансляцию или регулируют их и при наличии интронов оказывают влияние на сплайсинг РНК кодируемой области, функционально связанной с ними. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования. Секреторная последовательность сигнального пептида также может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Векторы могут также включать один или несколько генов селективируемых маркеров для облегчения отбора клеток-хозяев, в которые были встроены векторы. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи тезепелумаба, а также подходящие последовательности сигнального пептида и другие компоненты векторов экспрессии для рекомбинантной экспрессии тезепелумаба описаны в патенте США № 7982016, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, и изложены под SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11 в данном документе.

[89] После того, как вектор экспрессии был сконструирован, и одна или несколько молекул нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты тяжелой и легкой цепей тезепелумаба или его производного, были встроены в надлежащий(надлежащие) сайт(сайты) вектора или векторов, готовый(готовые) вектор(векторы) может(могут) быть встроены(встроены) в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию вектором экспрессии для тезепелумаба или его производного выбранной клетки-хозяина можно осуществлять посредством хорошо известных способов, включая трансфекцию, инфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ частично будет зависеть от применяемого типа клетки-хозяина. Данные способы и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области техники и изложены, например, в Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989).

[90] При культивировании в соответствующих условиях клетка-хозяин синтезирует тезепелумаб или его производное, которые впоследствии могут быть собраны из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует их в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей их (если они не секретируются). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые желаемы или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и простота

осуществления фолдинга в биологически активную молекулу.

[91] Иллюстративные клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот. Прокариотические клетки-хозяева включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacillus*, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии рекомбинантных полипептидов. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи наиболее часто применяются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в данном документе, такие как *Pichia*, например, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, например, *Schwanniomyces occidentalis*, и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

[92] Клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител можно получать из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступен ряд вирусных штаммов для трансфекции таких клеток, например, вариант L-1 NPV *Autographa californica* и штамм NPV Bm-5 *Bombyx mori*.

[93] Клетки-хозяева позвоночных также являются подходящими хозяевами, и рекомбинантное получение антител из таких клеток стало рутинной процедурой. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (АТСС), включая без ограничения клетки яичника китайского хомячка (СНО), включая клетки линии СНОК1 (АТСС CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (СНО, Urlaub *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980); линию клеток CV1 почки обезьяны, трансформированную с помощью SV40 (COS-7, АТСС CRL 1651); эмбриональную линию клеток почки человека (клетки линии 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham *et al*, J. Gen Virol. 36: 59, 1977); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, АТСС CCL 10); клетки Сертоли мыши (ТМ4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 АТСС CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, АТСС CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, АТСС CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, АТСС CCL 34);

клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки линии TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); клетки линии MRC 5 или клетки линии FS4; клетки миеломы млекопитающих и ряд других линий клеток. Клетки линии CHO являются предпочтительными клетками-хозяевами в некоторых вариантах осуществления для экспрессии тезепелумаба или его производных.

[94] Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют описанными выше векторами экспрессии для получения тезепелумаба или его производных и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Клетки-хозяева, применяемые для получения тезепелумаба или его производных, можно культивировать в ряде сред. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM, Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любую из сред, описанных в Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44, 1979; Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255, 1980; патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430 или WO 87/00195, можно применять в качестве среды для культивирования для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно при необходимости дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство Gentamycin™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п. являются такими, которые ранее применялись для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области техники.

[95] В ходе культивирования клеток-хозяев антитело можно получать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве, или оно может секретироваться непосредственно в среду. Если антитело получают внутриклеточно, на первой стадии клетки-хозяева лизируют (например, с помощью механического воздействия, осмотического шока или ферментативных способов), и дебрис в форме частиц (например, клетки-хозяева и лизированные фрагменты) удаляют, например, посредством центрифугирования, микрофльтрации или ультрафльтрации. Если антитело секретировается в культуральную среду, антитело можно отделить от клеток-хозяев посредством центрифугирования или микрофльтрации и необязательно в дальнейшем

концентрировать посредством ультрафильтрации. Тезепелумаб или его производные можно дополнительно очищать или частично очищать с применением, например, одной или нескольких стадий хроматографии, такой как аффинная хроматография (например, аффинная хроматография с белком А или белком G), катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, гидроксипатитная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий или хроматография в смешанном режиме.

[96] После того как композиция на основе тезепелумаба произведена или получена, композицию можно оценить на наличие и количество одного или нескольких производных тезепелумаба, описанных в данном документе, включая изомеризованные производные (включая их промежуточные продукты изомеризации), дезамидированные производные (включая их промежуточные продукты дезамидирования), окисленные производные, гликозилированные производные, производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, и производные по размеру (например НМВ соединения или фрагменты). Соответственно, настоящее изобретение включает способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба, включая получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба; измерение количества одного или нескольких производных тезепелумаба в композиции; сравнение измеренного количества одного или нескольких производных тезепелумаба с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. В некоторых вариантах осуществления способы включают одно, два, три, четыре, пять, шесть или семь из: (1) измерения количества изомеризованных производных (включая их промежуточные продукты изомеризации) в композиции, (2) измерения количества дезамидированных производных (включая их промежуточные продукты дезамидирования) в композиции, (3) измерения количества окисленных производных в композиции, (4) измерения количества гликозилированных производных в композиции, (5) измерения количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции, (6) измерения количества НМВ соединений в композиции и/или (7) измерения количества фрагментов в композиции. В определенных вариантах осуществления все семь измерений осуществляют в отношении композиции на основе тезепелумаба.

[97] Предварительно определенный эталонный критерий для каждого производного тезепелумаба может представлять собой пороговое количество или диапазон количеств производного, которые не оказывают значительного влияния на активность и/или переносимость композиции на основе тезепелумаба, например, в целях безопасности во время введения или в отношении ингибирования лиганд-индуцированной активации рецептора TSLP. Например, предварительно определенный эталонный критерий для каждого производного тезепелумаба может представлять собой любой из пределов или диапазонов, раскрытых в данном документе для каждого из производных,

поскольку композиции на основе тезепелумаба с данными пределами/диапазонами производных обладали активностью и/или переносимостью, сравнимой с композициями на основе тезепелумаба, которые оценивались в клинических испытаниях и демонстрировали клиническую эффективность. Следует понимать, что предварительно определенные эталонные критерии, описанные в данном документе, могут быть указаны до начала выполнения способа, описанного в данном документе.

[98] В определенных вариантах осуществления способов, если измеренное количество производного тезепелумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию, то композицию на основе тезепелумаба можно классифицировать как приемлемую и продвинуть на следующую стадию процесса изготовления или распространения, например, посредством получения фармацевтического состава из композиции (например, посредством объединения с одним или несколькими вспомогательными веществами или разбавителями); посредством получения фармацевтического продукта из композиции (например, посредством заполнения флаконов, шприцев, автоинъекторов или других контейнеров или устройств для доставки); упаковки композиции с инструкциями по применению, разбавителями и/или устройствами для доставки или выпуска композиции для коммерческой продажи или доставки дистрибьюторам. В некоторых вариантах осуществления способов фармацевтический состав композиции на основе тезепелумаба получают, если измеренное количество производного тезепелумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию. В других вариантах осуществления способов фармацевтический продукт из композиции на основе тезепелумаба получают, если измеренное количество производного тезепелумаба в композиции соответствует предварительно определенному эталонному критерию. Способы получения фармацевтических составов и фармацевтических продуктов из композиций на основе тезепелумаба более подробно описаны ниже. Если измеренное количество производного тезепелумаба в композиции не соответствует предварительно определенному эталонному критерию, то в некоторых вариантах осуществления способов композицию на основе тезепелумаба можно классифицировать как неприемлемую и удалить, уничтожить или подвергнуть дополнительным стадиям изготовления, таким как дополнительная очистка для удаления или снижения количества производного тезепелумаба в композиции таким образом, чтобы удовлетворялся предварительно определенный эталонный критерий.

[99] В одном варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и изомеризованные производные тезепелумаба (включая их промежуточные продукты изомеризации); измерение количества изомеризованных производных в композиции; сравнение измеренного количества изомеризованных производных с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный

эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 30%, например, менее приблизительно 25%, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 6% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 15% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 13% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет менее приблизительно 10%, приблизительно 8%, приблизительно 5%, приблизительно 3% или приблизительно 2%. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба может представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,5% до приблизительно 13% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 1% до приблизительно 10% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% композиции на основе тезепелумаба. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованного производного в композиции на основе тезепелумаба составляет менее приблизительно 5%, 4%, 3%, 2% или 1% изомеризации по D54 в SEQ ID NO: 7 в варибельной области либо одной, либо обеих цепей. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества изомеризованного производного в композиции на основе тезепелумаба составляет менее приблизительно 13%, приблизительно 10%, приблизительно 8%, приблизительно 5%, приблизительно 3% или приблизительно 2% изомеризации по одному или нескольким из D49, D50 или D52 в SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах осуществления количество изомеризованных производных в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

[100] В одном варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и дезамидированные производные тезепелумаба (включая их промежуточные продукты дезамидирования); измерение количества дезамидированных производных в композиции; сравнение измеренного количества дезамидированных производных с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный

эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 15%, например, приблизительно 13% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 4% или меньше, приблизительно 3% или меньше, приблизительно 2% или меньше или приблизительно 1% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 7% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированного производного в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 5% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 2% или меньше. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба может представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,4% до приблизительно 10% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 1% до приблизительно 7% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% композиции на основе тезепелумаба. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует менее приблизительно 3% дезамидирования по N25/N26 в последовательности LCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 3. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует менее приблизительно 13% дезамидирования по N316 в последовательности тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13, и/или N385/390 в последовательности тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления количество дезамидированных производных в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

[101] В одном варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и окисленные производные тезепелумаба; измерение количества окисленных производных в композиции; сравнение измеренного количества окисленных производных с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба

может составлять менее приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 4% или меньше, приблизительно 3% или меньше, приблизительно 2% или меньше или приблизительно 1% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 7% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 5% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 3% или меньше. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба может представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,1% до приблизительно 7% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 0,4% до приблизительно 5% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 0,8% до приблизительно 3% композиции на основе тезепелумаба. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует приблизительно 7% или меньше окисления по W102 в последовательности HCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 8, или приблизительно 6% или меньше, или приблизительно 5% или меньше, или приблизительно 3% или меньше. В определенных вариантах осуществления количество окисленных производных в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

[102] В одном варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и гликозилированные производные тезепелумаба; измерение количества гликозилированных производных в композиции; сравнение измеренного количества гликозилированных производных с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 40%, например, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 6% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в

композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 30% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 20% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 15% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 10% или меньше. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба может представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 1% до приблизительно 40% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 4% до приблизительно 30% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 2% до приблизительно 20% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 5% до приблизительно 15% композиции на основе тезепелумаба. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует гликозилированию с обеспечением высокого содержания маннозы в композиции, составляющему приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует гликозилированию с обеспечением высокого содержания маннозы в композиции, составляющему приблизительно 25% или меньше, приблизительно 23% или меньше (например, приблизительно 23,1% или меньше), приблизительно 21% или меньше, приблизительно 19% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует гликозилированию с обеспечением высокого содержания маннозы в композиции, составляющему приблизительно 23,1% или меньше. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует галактозилированию в композиции, составляющему приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше,

приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В различных вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба соответствует афукозилированному гликозилированию, составляющему приблизительно 5% или меньше, приблизительно 4% или меньше, приблизительно 3% или меньше, приблизительно 2% или меньше, приблизительно 1% или меньше. В определенных вариантах осуществления количество гликозилированных производных в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством картирования гликанов.

[103] В одном варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и производные тезепелумаба, представляющие собой дисульфидные изоформы; измерение количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции; сравнение измеренного количества дисульфидных изоформ с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 75%, например, приблизительно 70% или меньше, приблизительно 65% или меньше, приблизительно 55% или меньше, приблизительно 50% или меньше, приблизительно 45% или меньше, приблизительно 40% или меньше, приблизительно 35% или меньше, приблизительно 30% или меньше, приблизительно 25% или меньше, приблизительно 20% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 6% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 50% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 35% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 25% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 15% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества

производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 10% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 8% или меньше. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества окисленных производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, на основе тезепелумаба может представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 10% до приблизительно 70% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 15% до приблизительно 50% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 20% до приблизительно 40% композиции на основе тезепелумаба. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 50% или меньше изоформы IgG2-A/B. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 5% или меньше изоформы IgG2-B. В определенных вариантах осуществления количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством обращенно-фазовой HPLC.

[104] В другом варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и HMW соединения тезепелумаба; измерение количества HMW соединений в композиции; сравнение измеренного количества HMW соединений с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества HMW соединений в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 20%, например, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 9% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. Предварительно определенный эталонный критерий для количества HMW соединений в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 3,0%, например, приблизительно 2,5% или меньше, приблизительно 2,4% или меньше, приблизительно 2,3% или меньше, приблизительно 2,2% или меньше, приблизительно 2,1% или меньше, приблизительно 2,0% или меньше, приблизительно 1,8% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,8% или меньше,

приблизительно 0,6% или меньше или приблизительно 0,4% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 2,5% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,7% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,4% или меньше. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,2% или меньше. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 0,6% или меньше. Предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба может в некоторых вариантах осуществления представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,3% до приблизительно 2,4% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 0,6% до приблизительно 2,1% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 0,6% до приблизительно 1,4% композиции на основе тезепелумаба. В определенных вариантах осуществления количество НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством SE-HPLC, например, посредством SE-UHPLC, SE-HPLC-SLS или ультрацентрифугирования со скоростной седиментацией (SV-AUC).

[105] В другом варианте осуществления способы оценки качества композиции на основе тезепелумаба включают получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и фрагменты (например, LMW или MMW) тезепелумаба; измерение количества фрагментов в композиции; сравнение измеренного количества фрагментов с предварительно определенным эталонным критерием и получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно определенный эталонный критерий удовлетворяется. Предварительно определенный эталонный критерий для количества НМВ соединений в композиции на основе тезепелумаба может составлять приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 9% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 7% или меньше, приблизительно 6% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. Предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба может составлять менее приблизительно 3,0%, например, приблизительно 2,5% или меньше, приблизительно 2,4% или меньше, приблизительно 2,3% или меньше, приблизительно 2,2% или меньше, приблизительно 2,1% или меньше, приблизительно

2,0% или меньше, приблизительно 1,8% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,8% или меньше, приблизительно 0,6% или меньше или приблизительно 0,4% или меньше. В одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 2,5% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,7% или меньше. В другом варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,4% или меньше. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 1,2% или меньше. В еще одном варианте осуществления предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба составляет приблизительно 0,6% или меньше. Предварительно определенный эталонный критерий для количества фрагментов в композиции на основе тезепелумаба может в некоторых вариантах осуществления представлять собой диапазон количеств, например, от приблизительно 0,3% до приблизительно 2,4% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 0,6% до приблизительно 2,1% композиции на основе тезепелумаба, от приблизительно 0,4% до приблизительно 1,2% композиции на основе тезепелумаба или от приблизительно 0,6% до приблизительно 1,4% композиции на основе тезепелумаба. В определенных вариантах осуществления количество фрагментов в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством rCE-SDS.

[106] В определенных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы включают:

(a) получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где производные тезепелумаба предусматривают изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, гликозилированные производные, производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, HMW соединения, фрагменты или их комбинации;

(b) оценку композиции на основе тезепелумаба посредством осуществления одного или нескольких из следующего:

(i) измерения количества изомеризованных производных в композиции посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 30% или меньше;

(ii) измерения количества дезамидированных производных в композиции посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях и сравнения

измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 15% или меньше;

(iii) измерения количества окисленных производных в композиции посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 7% или меньше;

(iv) измерения количества гликозилированных производных в композиции посредством картирования гликанов и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 40% или меньше;

(v) измерения количества производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 75% или меньше;

(vi) измерения количества HMW соединений в композиции по префикам при SE-UHPLC и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 20% или меньше, и/или

(vii) измерения количества фрагментов в композиции по префикам при rCE-SDS и сравнения измеренного количества с предварительно определенным эталонным критерием, составляющим приблизительно 15% или меньше,

и

(c) получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение или сравнения на стадии (b) указывают на то, что предварительно определенный(определенные) эталонный(эталонные) критерий/критерии удовлетворяется(удовлетворяются). В некоторых вариантах осуществления осуществляют все стадии (b)(i), (b)(ii), (b)(iii), (b)(iv), (b)(v), (b)(vi) и (b)(vii). В других вариантах осуществления осуществляют только стадии (b)(vi) и (b)(vii). В определенных вариантах осуществления осуществляют стадии (b)(iv), (b)(vi) и (b)(vii).

Выявление признаков, вносящих вклад в связывание белка

[107] Чтобы определить признаки, которые вносят вклад в связывание белка и активность, антитело к TSLP, представляющее собой тезепелумаб, описанное в данном документе, помещают в условия, которые приводят к изменению его структуры, например, изменению структуры аминокислоты терапевтического белка, приводящему к образованию производного терапевтического белка. В иллюстративных аспектах измененная структура аминокислоты называется "признаком" и может быть охарактеризована с точки зрения ее химической идентичности или типа и местоположения признака в пределах аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка, например, положения аминокислоты, в которой

присутствует признак. Например, остатки аспарагина и глутамина восприимчивы к дезамидированию. Дезамидированный аспарагин в положении 10 аминокислотной последовательности белка является примером признака. Перечень иллюстративных типов признака для конкретных аминокислот представлен в таблице А. Таким образом, "структура", применяемая в данном документе, может включать тип признака, перечисленный в таблице А, или комбинацию двух или более типов признака, перечисленных в таблице А, состоять по сути из них или состоять из них. Следует понимать, что признаки являются примерами структур, и, если не указано иное, во всех случаях, когда в данном документе упоминается "структура", признак рассматривается в качестве примера структуры. Например, высокомолекулярные (HMW) соединения и фрагменты также являются примерами признаков.

[108] Таблица А

<u>Иллюстративный тип признака</u>	<u>Аминокислотный остаток</u>
Дезамидирование	Asn, Gln
Дезаминирование	Glu, Ser, Gly
Гликирование, гидроксизин	Lys
Гликозилирование	Asn
Циклизация	N-концевой Gln, N-концевой Glu
Окисление	Met, Trp, His
Изомеризация	Asp
Фрагментация/усечение	Asp/Pro

[109] Поскольку иммуноглобулин или его фрагмент, антитело или антигенсвязывающий белок, такой как тезепелумаб, содержит множество аминокислот, антитело или антигенсвязывающий белок, описанные в данном документе, могут иметь более одного признака (например, более одной аминокислоты, имеющей измененную структуру) и могут быть описаны с точки зрения профиля их признаков. Применяемый в данном документе термин "профиль признаков" относится к перечню признаков антигенсвязывающего белка. В различных случаях профиль признаков обеспечивает химическую идентичность или тип признака, например, дезамидирование, необязательно, относительно нативной структуры терапевтического белка. В различных случаях профиль признаков предусматривает местоположение признака, например, положение аминокислоты, в которой присутствует признак. Профиль признаков в некоторых аспектах предусматривает описание всех признаков, присутствующих в антигенсвязывающем белке. В других аспектах профиль признаков обеспечивает описание подмножества признаков, присутствующих в белке. Например, профиль признаков может предусматривать только те признаки, которые присутствуют в конкретной части белка, например, в константной области, вариабельной области, CDR (таких как три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи). Соединение терапевтического

белка, такое как антитело или антигенсвязывающий белок, характеризуется наличием признака(признаков), присутствующего(присутствующих) в белке. Соединение антитела или антигенсвязывающего белка может отличаться от другого соединения того же белка наличием другого профиля признаков. Когда два терапевтических белка имеют отличающиеся профили признаков, терапевтические белки представляют собой два различных соединения или производных терапевтического белка. Когда два терапевтических белка имеют идентичные профили признаков, эти терапевтические белки считаются одним и тем же соединением или производным терапевтического белка.

[110] В различных случаях иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, которые приводят к изменению его структуры, например, формированию одного или нескольких признаков, и изменение структуры может изменить аффинность терапевтического белка в отношении его мишени. В различных аспектах иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, которые приводят к изменению его структуры, например, формированию одного или нескольких признаков, и изменение структуры может снизить аффинность антигенсвязывающего белка в отношении его мишени. Снижение аффинности в некоторых аспектах приводит к частичной или полной потере способности иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка взаимодействовать с мишенью (например, связываться с ней). В различных случаях частичная или полная потеря способности иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка взаимодействовать с мишенью (например, связываться с ней) в конечном итоге приводит к снижению эффективности антигенсвязывающего белка. В альтернативных случаях иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, которые приводят к изменению его структуры, например, формированию одного или нескольких признаков, и изменение структуры не изменяет аффинность иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка в отношении его мишени. В различных аспектах изменение структуры не приводит к снижению аффинности белка в отношении его мишени. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, способы по настоящему изобретению преимущественно позволяют четко и точно проводить различия между теми признаками иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка, которые оказывают влияние на взаимодействие между иммуноглобулином, антителом или антигенсвязывающим белком и мишенью, и признаками, которые не оказывают влияние на это взаимодействие.

[111] В различных аспектах композиция, предусмотренная в данном документе, содержит популяцию соединений или производных иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента. В различных случаях популяция представляет собой гомогенную популяцию иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, при этом необязательно каждый из белков, присутствующих в образце композиции, относится к одному и тому же соединению или производному. В различных

случаях популяция представляет собой гетерогенную популяцию, содержащую по меньшей мере два разных соединения или производных иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, имеющих описанный в данном документе признак. В различных аспектах гетерогенная популяция содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или больше разных соединений или производных иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента. Необязательно гетерогенная популяция содержит более 7, более 8, более 9, более 10, более 20, более 30, более 40, более 50 разных соединений или производных белка. Каждое соединение или производное в популяции в некоторых аспектах имеет уникальный профиль признаков. В иллюстративных случаях соединения иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента являются единственными белками, присутствующими в композиции. В некоторых аспектах композиция содержит (i) иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент из популяции, иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента в гетерогенной популяции предусматривают признак, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления не более 20%, 15%, 10%, 5% или 1% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента в гетерогенной популяции предусматривают признак, описанный в данном документе.

Разделение

[112] В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы разделения смеси, содержащей разные соединения антигена на по меньшей мере две фракции. В некоторых аспектах смесь разделяют на несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) фракций. В некоторых аспектах стадия разделения раскрытых в настоящем документе способов обеспечивает сохранение нативного фолдинга, структуры высокого порядка и связывающей способности антигенсвязывающего белка и его мишени. В различных аспектах смесь разделяют на несвязанную фракцию, содержащую несвязанные антитело или антигенсвязывающие белки или мишени, и связанную фракцию, содержащую комплексы антитело/антигенсвязывающий белок-мишень.

[113] Подходящие способы и методики разделения смесей на фракции известны из уровня техники. См., например, Coskun, North Clin Istanb 3(2): 156-160 (2016); Snyder et al., Practical HPLC Method Development, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. 1997; Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2010; Heftmann, Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related

differential migration methods, 6th ed., Volume 69A, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2004; Mori and Barth, Size Exclusion Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, 1999. В некоторых аспектах разделение происходит на основании заряда, как, например, в ионообменной хроматографии, капиллярном изоэлектрическом фокусировании (cIEF) и/или капиллярном зонном электрофорезе (CZE), или на основании гидрофобности, как, например, при разделении в обращенно-фазовой хроматографии (RP; например, RP-HPLC) и хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC). В различных аспектах разделение происходит на основании размера, как, например, в эксклюзионной хроматографии (SEC; например, SE-HPLC), электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), капиллярном электрофорезе с додецилсульфатом натрия (CE-SDS). Описанные в данном документе способы применяют для обнаружения окисления продукта по остаткам Met или Trp, фрагментации/отсечения, изомеризации Asp, дезамидирования, образования пироглутаминовой кислоты на N-конце. В различных вариантах осуществления смесь разделяют на по меньшей мере две фракции с применением методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании размера, заряда, гидрофобности, аффинности к захватывающей молекуле или их комбинации. В различных случаях эта методика представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC), аффинную хроматографию, осаждение с применением гранул или клеток, фракционирование в свободном потоке (FFF), ионообменную хроматографию (IEX), катионообменную хроматографию (CEX), хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC) или ультрацентрифугирование (UC). Смесь необязательно разделяют на по меньшей мере две фракции с применением методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании размера, где методика необязательно представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC).

[114] В различных аспектах смесь разделяют на по меньшей мере две фракции с применением методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании аффинности в отношении захватывающей молекулы, связанной с твердой подложкой, необязательно гранулой или клеткой. В различных случаях смесь разделяют посредством (i) добавления смеси в контейнер, например, пробирку, содержащую гранулы, связанные с захватывающей молекулой, или клетки, экспрессирующие на своей поверхности захватывающую молекулу, (ii) центрифугирования контейнера (например, пробирки) с получением надосадочной жидкости и осадка, (iii) сбора надосадочной жидкости из осадка с получением несвязанной фракции, (iv) высвобождения связанной фракции из осадка с помощью раствора, (v) центрифугирования контейнера (например, пробирки), содержащего осадок и раствор, с получением второй надосадочной жидкости, содержащей связанную фракцию, и второго осадка, содержащего гранулы или клетки, и (vi) сбора второй надосадочной жидкости с получением связанной фракции. В некоторых аспектах смесь разделяют посредством (i) добавления смеси в колонку, содержащую гранулы, связанные с захватывающей молекулой, с получением проточной и связанной фракций, (ii) сбора проточной фракции с получением несвязанной фракции, (iii)

высвобождения связанной фракции из гранул с помощью раствора и сбора раствора, содержащего связанную фракцию. Подходящие твердые подложки включают, например, гранулы, смолу, бумагу, необязательно изготовленную из целлюлозы, кремнезем, глинозем, стекло, пластик или их комбинацию. В иллюстративных аспектах захватывающая молекула, связанная с твердой подложкой, представляет собой белок. Захватывающая молекула может быть идентична мишени. Захватывающая молекула преимущественно не ограничена какой-либо конкретной молекулой.

[115] В различных вариантах осуществления способа выявления признаков иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка (например, тезепелумаба) или мишени, которые оказывают влияние на взаимодействие между антигенсвязывающим белком и мишенью, для каждой из несвязанной фракции и связанной фракции способ включает выявление и количественную оценку обилия каждого признака, присутствующего в соединении или производном антигенсвязывающего белка или мишени, где, если обилие признака в несвязанной фракции превышает обилие признака в связанной фракции, этот признак оказывает отрицательное влияние на взаимодействие между антигенсвязывающим белком и мишенью. В различных аспектах способ включает применение масс-спектрометра для выявления и количественного определения обилия каждого признака соединения антигенсвязывающего белка или мишени в каждой из несвязанной фракции и связанной фракции.

[116] В различных вариантах осуществления способа определения эффекта известного признака, присутствующего в соединении антигенсвязывающего белка или мишени, в отношении взаимодействия между антигенсвязывающим белком и мишенью способ включает для каждой из несвязанной фракции и связанной фракции количественное определение обилия известного признака, где в случае, если обилие известного признака в несвязанной фракции превышает обилие известного признака в связанной фракции, известный признак оказывает отрицательный эффект в отношении взаимодействия между антигенсвязывающим белком и мишенью. В различных аспектах способ включает применение масс-спектрометра для количественного определения обилия известного признака в каждой из несвязанной фракции и связанной фракции.

[117] Стабильность относится к устойчивости к химическим модификациям аминокислотных остатков и биофизическим модификациям белка, таким как образование НМВ соединений в стрессовых условиях, которые могут иметь место в ходе изготовления, хранения, и/или дополнительных или альтернативных стрессовых условиях. Для способов и иммуноглобулинов, антигенсвязывающих белков и их фрагментов согласно вариантам осуществления, описанным в данном документе, "стабильность" и/или "НМВ соединения" могут быть определены с применением эксклюзионной хроматографии (SEC). Композицию, содержащую иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или производное, можно разделить посредством SEC, например, SEC-UV. В SEC может применяться подвижная фаза, содержащая 100 мМ фосфата натрия и 250 мМ NaCl (рН 6,8), скорость потока может быть установлена на 0,5 мл/мин,

температура колонки может быть установлена на 37°C, время хроматографирования может составлять 35 минут, и автоматический пробоотборник может быть установлен на 4°C. Пример подходящей колонки для SEC включает колонку с гелем, содержащую частицы кремнезема, содержащие диольную функциональную группу и имеющие средний диаметр, составляющий 5 мкм, и средний размер пор, составляющий приблизительно 25 нМ (коммерчески доступную, например, в качестве колонки G3000SWxl от TOSOH Bioscience). В случае SEC-UV детекцию методом спектрометрии в ультрафиолетовой/видимой области спектра (UV/VIS) можно осуществлять при 214 нм и 280 нм. Следует принимать во внимание, что после разделения пики, представляющие мономерные и HMW соединения, могут элюироваться в разные моменты времени в SEC-профиле элюирования.

[118] После SEC-анализа необязательно можно провести пептидное картирование и можно выявить модификации пептидов, ассоциированные со связанными и несвязанными соединениями, например, как описано в данном документе и/или в международной публикации № WO 2020/247790. Для пептидного картирования элюируемые фракции можно собирать с применением фильтра с порогом отсечения по молекулярной массе (например, больше 10 кДа) и элюировать 7,5 М гуанидиновым элюирующим буфером. Для определения химических модификаций, оказывающих влияние на связывание с антигеном, подвергнутый стрессу иммуноглобулин (или антигенсвязывающий белок или его фрагмент) и антиген могут быть смешаны вместе и разделены на элюируемый раньше комплекс, связанный с антигеном, и элюируемый позже несвязанный иммуноглобулин (или антигенсвязывающий белок или его фрагмент). Для определения химических модификаций, влияющих на HMW или коррелирующих с ними, могут быть собраны мономерные и HMW соединения.

[119] Следует принимать во внимание, что "аффинность" или "связывание" можно определить посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), биослойной интерферометрии или также посредством экспериментов по определению аффинности связывания методом SEC, как описано в данном документе. Если в данном документе не указано иное или иное не требуется в соответствии с научным контекстом, "аффинность" понимают как относящуюся к аффинности, измеренной посредством SPR. Значение Kd можно измерить посредством метода SPR с применением биосенсорной системы, такой как система BIAcore®. Анализ с помощью системы BIAcore® может включать анализ связывания и диссоциации антигена (например, TSLP) на чипах с иммобилизованными молекулами (например, иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом, связывающимся с TSLP, описанными в данном документе) на их поверхности. Связывающие комплексы с Kd, составляющей $< 10^{-6}$ М, можно обнаружить с применением метода SPR. В различных вариантах осуществления SPR можно проводить при 20°C, 25°C, 30°C или 37°C.

Композиции

[120] Следует понимать, что нумерация остатков в тезепелумабе основана на

вариабельных последовательностях тяжелой цепи и легкой цепи, изложенных под SEQ ID NO: 10 и 12 соответственно, а также последовательностях тяжелой цепи и легкой цепи полноразмерного антитела, изложенных под SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.

[121] В различных вариантах осуществления предусмотрена композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, где производные предусматривают по меньшей мере одно из изомеризованных производных, дезамидированных производных, окисленных производных, гликозилированных производных, HMW соединений, фрагментов, производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, или их комбинаций. В различных вариантах осуществления композиция содержит тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, при этом каждое из которых содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 12.

[122] Изомеризованные производные предусматривают изменение остатков аспарагиновой кислоты. Примеры изомеризации по аспарагиновой кислоте включают изоаспарагиновую кислоту (isoAsp), циклический аспартат (cAsp), сукцинимид или другие промежуточные продукты изомеризации. Изомеризованное производное в композиции может предусматривать производное в определяющей комплементарности области (CDR) тяжелой цепи или легкой цепи или в пределах других частей вариабельной области. В различных вариантах осуществления изомеризация происходит в CDR. Изомеризованное производное предусматривает изменение D54 CDR тяжелой цепи в SEQ ID NO: 7 и/или D49, D50 или D52 CDR легкой цепи в SEQ ID NO: 4 в вариабельной области либо одной, либо обеих цепей. В различных вариантах осуществления количество изомеризованного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 30% или от приблизительно 0,5% до 13%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит тезепелумаб и его производные, где изомеризация по D54 происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 5%, и/или где изомеризация по одному или нескольким из D49, D50 или D52 происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 13%. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 30% изомеризованного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного

TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 30% изомеризованного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[123] Дезамидированные производные предусматривают изменение остатков аспарагина. Иллюстративные дезамидированные производные включают продукты полного дезамидирования и промежуточные продукты дезамидирования. Дезамидированное производное в композиции может содержать дезамидированный аспарагин N25/N26 в последовательности LCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 3, N316 в последовательности вариабельной области тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13, и/или N385/390 в последовательности вариабельной области тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13. В различных вариантах осуществления композиция содержит дезамидированное производное, предусматривающее дезамидирование по N25/N26 в количестве, составляющем менее приблизительно 3%, и/или дезамидирование по одному или нескольким из N316 и/или N385/390 в количестве, составляющем менее приблизительно 13%. В некоторых вариантах осуществления количество дезамидированного производного в композиции составляет приблизительно 0,5% - 10%. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% дезамидированного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% дезамидированного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[124] Окисленные производные предусматривают изменение одного или нескольких остатков метионина или триптофана в белке. Иллюстративные окисленные производные включают продукты полного окисления или промежуточные продукты окисления. Окисленное производное в композиции может предусматривать окисление по одному или нескольким из метионина M34 тяжелой цепи из последовательности HCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 6, или M253 или M359 в последовательности константной области тяжелой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 13, или триптофана W52 тяжелой цепи в последовательности HCDR2, изложенной под SEQ ID NO: 7, W90 в последовательности LCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 5, или W102 в

последовательности HCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 8, в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (или легких цепях, в соответствующих случаях). Например, окисленное производное в композиции может предусматривать окисление по одному или нескольким из метионина M34 тяжелой цепи в последовательности HCDR1, изложенной под SEQ ID NO: 6, триптофана W52 тяжелой цепи в последовательности HCDR2, изложенной под SEQ ID NO: 7, W90 легкой цепи из последовательности LCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 5, или W102 тяжелой цепи в последовательности HCDR3, изложенной под SEQ ID NO: 8, в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях (или легких цепях, в соответствующих случаях). В различных вариантах осуществления окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из метионина тяжелой цепи M34, M253, M359 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 7%. В различных вариантах осуществления окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из триптофана W52, W90 или W102 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 7%, необязательно менее приблизительно 5% или менее приблизительно 3%. В некоторых вариантах осуществления количество окисленного производного в композиции составляет от приблизительно 0,4% до приблизительно 7%. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 7% окисленного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 7% окисленного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[125] Высокомолекулярные производные предусматривают агрегацию антител либо в димеры, либо в более крупные белковые агрегаты. HMW соединения, рассматриваемые в данном документе, включают димеры и олигомеры тезепелумаба. В различных вариантах осуществления HMW соединения представляет собой димер. В различных вариантах осуществления димеры связаны ковалентно или нековалентно. В различных вариантах осуществления количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 1,7% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,5% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,3% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,1% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,9% или меньше, приблизительно 0,8% или меньше, приблизительно 0,7% или меньше, приблизительно 0,6% или меньше,

приблизительно 0,5% или меньше или приблизительно 0,4% или меньше. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% НМВ соединений, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% НМВ соединений, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[126] Производные, представляющие собой фрагмент тезепелумаба, включают белковые продукты, которые могут быть расщеплены внутренними пептидазами во время получения или получены на других стадиях процесса получения. Фрагменты тезепелумаба включают низкомолекулярные (LMW) соединения, например, с молекулярным весом, составляющим менее приблизительно 25 кДа, или среднемолекулярные (MMW) соединения, например, с молекулярным весом, составляющим от 25 кДа до 50 кДа, или их комбинации. В различных вариантах осуществления количество фрагментов в композиции составляет приблизительно 1,7% или меньше, приблизительно 1,6% или меньше, приблизительно 1,5% или меньше, приблизительно 1,4% или меньше, приблизительно 1,3% или меньше, приблизительно 1,2% или меньше, приблизительно 1,1% или меньше, приблизительно 1,0% или меньше, приблизительно 0,9% или меньше, приблизительно 0,8% или меньше, приблизительно 0,7% или меньше, приблизительно 0,6% или меньше, приблизительно 0,5% или меньше или приблизительно 0,4% или меньше. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% соединений, представляющих собой фрагмент, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% соединений, представляющих собой фрагмент, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[127] Гликозилированные производные тезепелумаба предусматривают изменение профиля остатков сахара, которое может быть посттрансляционно применено в отношении остатков аспарагина в Fc-области антитела. Иллюстративные гликозилированные производные предусматривают афукозилирование, применение

галактозильных структурных единиц (галактозилирование) и применение структурных единиц с высоким содержанием маннозы в отношении аспарагина. Гликозилированные производные, рассматриваемые в данном документе, представляют собой изменения остатков сахара по аспарагину N298 в последовательности Fc-области, изложенной под SEQ ID NO: 13 в одной или обеих из тяжелых цепей. В различных вариантах осуществления количество гликозилированного производного в композиции составляет менее приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10% или приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления гликозилированное производное предусматривает афукозилированные производные в количестве, составляющем менее приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3% или приблизительно 2%. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит галактозильные структурные единицы в количестве, составляющем менее приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10% или приблизительно 5%. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит структурные единицы с высоким содержанием маннозы в количестве, составляющем приблизительно 25% или меньше, приблизительно 23% или меньше (например, приблизительно 23,1% или меньше), приблизительно 21% или меньше, приблизительно 19% или меньше, приблизительно 17% или меньше, приблизительно 15% или меньше, приблизительно 12% или меньше, приблизительно 10% или меньше, приблизительно 8% или меньше, приблизительно 5% или меньше или приблизительно 4% или меньше. В различных вариантах осуществления гликозилированные производные содержат структурные единицы с высоким содержанием маннозы в количестве, составляющем приблизительно 23,1% или меньше. В различных вариантах осуществления гликозилированное производное содержит структурные единицы с высоким содержанием маннозы в количестве, составляющем менее приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более 15%, 13%, 11%, 8% или 5% структурных

единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом (и/или более длительным периодом полужизни), чем композиция, содержащая более 15% структурных единиц с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более приблизительно 25%, приблизительно 23%, приблизительно 21%, приблизительно 19%, приблизительно 17%, приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8% или приблизительно 5% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом (и/или более длительным периодом полужизни), чем композиция, содержащая более приблизительно 25% структурных единиц с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более приблизительно 23,1% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом (и/или более длительным периодом полужизни), чем композиция, содержащая более приблизительно 23,1% структурных единиц с высоким содержанием маннозы. Процент структурных единиц с высоким содержанием маннозы можно определить посредством HILIC.

[128] Выражение тезепелумаб или производные тезепелумаба с "меньшим клиренсом" означает, что величина клиренса из организма (крови или сыворотки крови) меньше по сравнению с клиренсом эталонного антитела, например, тезепелумаба или другого антитела IgG2. Клиренс тезепелумаба или производных тезепелумаба может составлять менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% или больше от уровней клиренса по сравнению с эталонным антителом. "Более длительный период полужизни" тезепелумаба или производных тезепелумаба означает промежуток времени, в течение которого антитело обнаруживается в организме (крови или сыворотке крови), который является более длительным по сравнению с периодом полужизни эталонного антитела, например, тезепелумаба или другого антитела IgG2, в организме. Период полужизни тезепелумаба или производных тезепелумаба может быть на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% или более длительным, чем период полужизни эталонного антитела.

[129] В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 40%, 35%, 30%, 25%, 23%, 21%, 20%, 19%, 18, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% или 4% гликозилированных производных.

[130] Активность и/или переносимость гликозилированных производных также может быть ассоциирована с эффекторной функцией и клиренсом антитела. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8% или приблизительно 6% гликозилированных производных с высоким

содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 25%, приблизительно 23%, приблизительно 19%, приблизительно 17%, приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8% или приблизительно 6% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом антитела и/или большей переносимостью, чем композиция, содержащая более приблизительно 23,1% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы.

[131] Структурная гетерогенность, обусловленная дисульфидными связями, присуща рекомбинантным и встречающимся в природе молекулам IgG2, которые содержат 18 дисульфидных связей, 6 межцепочечных и 12 внутрицепочечных. Пептиды шарнир:шарнир содержат четыре дисульфидные связи в классической структуре IgG2-A. В отличие от классической структуры IgG2-A изомер IgG2-B содержит симметричные связи, соединяющие две копии пептидов Fab (C_H1-C_L-шарнир) с двумя копиями шарнирного пептида. IgG2-A/B представляет собой промежуточную форму, объединяющую частичные свойства как IgG2-A, так и IgG2-B, определяемые асимметричным строением, включающим одно плечо Fab, ковалентно связанное с двумя копиями шарнирного пептида через дисульфидные связи. Производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-B и/или изоформу IgG2-A/B. В различных вариантах осуществления количество производного, представляющего собой дисульфидную изоформу, в композиции составляет менее приблизительно 75%. В некоторых вариантах осуществления, когда производное предусматривает предусматривают изоформу IgG2-B, количество производного, представляющего собой дисульфидную изоформу, в композиции составляет менее приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10% или приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления, когда производное предусматривает изоформу IgG2-A/B, количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет менее приблизительно 75%, приблизительно 70%, приблизительно 65%, приблизительно 60%, приблизительно 55%, приблизительно 50%, приблизительно 45% или приблизительно 35%. В различных вариантах осуществления количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 38% до приблизительно 43%. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 75% производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле. В различных вариантах осуществления тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем

композиция, содержащая более 75% производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

[132] В различных вариантах осуществления композиция обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

(a) количество изомеризованных производных в композиции составляет приблизительно 30% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях;

(b) количество дезамидированных производных в композиции составляет приблизительно 15% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования;

(c) количество окисленных производных в композиции составляет приблизительно 7% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях;

(d) количество гликозилированных производных в композиции составляет приблизительно 40% или меньше, как измерено посредством картирования гликанов;

(e) количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции составляет приблизительно 75% или меньше, как измерено посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях;

(f) количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 20% или меньше, как измерено посредством SE-HPLC, и/или

(g) количество фрагментов в композиции составляет приблизительно 15% или меньше, как измерено посредством rCE-SDS.

[133] В некоторых вариантах осуществления композиция является частью состава, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой лекарственное вещество, применяемое для получения состава, описанного в данном документе.

Способы введения

[134] В одном аспекте способы по настоящему изобретению включают стадию введения терапевтического антитела к TSLP или производного антитела, описанного в данном документе, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе или вспомогательном веществе. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой стерильную композицию.

[135] В данном документе рассматриваются способы лечения воспалительного заболевания, состояния или нарушения, такого как астма, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), атопический дерматит, эозинофильный эзофагит (EoE), назальные полипы, хроническая спонтанная крапивница, заболевание, обусловленное Ig, IgA-нефропатия, волчаночный нефрит, эозинофильный гастрит, хронический синусит без

назальных полипов и идиопатический легочный фиброз (IPF), с помощью антитела или антигенсвязывающего белка или его фрагментов, связывающихся с TSLP, описанных в данном документе. В различных вариантах осуществления заболевание, состояние или нарушение представляет собой астму, включая эозинофильную или неэозинофильную астму и астму с низким уровнем эозинофилов.

[136] Астма представляет собой хроническое воспалительное нарушение со стороны дыхательных путей. Ежегодно на долю астмы приходится около 1,1 миллиона амбулаторных посещений, 1,6 миллиона посещений отделений неотложной помощи, 444000 госпитализаций (Defrances et al., 2008), доступно по адресу: веб-сайт Центров по контролю заболеваний, www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr005.pdf, и 3500 смертей в США. У предрасположенных к заболеванию индивидуумов астматическое воспаление вызывает повторяющиеся эпизоды свистящего дыхания, одышки, ощущения стеснения в груди и кашля. Считается, что этиология астмы является многофакторной, и на нее влияют как генетические механизмы, так и механизмы окружающей среды (To et al., BMC Public Health 2012;12:204; Chung et al. Eur Respir J 2014;43:343-73), при этом важной причиной являются аллергены окружающей среды (Chung et al., выше; Pavord ID, et al., NPJ Prim Care Respir Med 2017;27:17). Большинство случаев возникает тогда, когда человек становится гиперчувствительным к аллергенам (атопия). Атопия характеризуется увеличением количества клеток Th2, а также экспрессии цитокинов Th2 и продуцирования IgE. Считается, что у примерно 10 миллионов пациентов в Соединенных Штатах Америки имеется астма, индуцированная аллергией. Несмотря на доступные варианты терапии, астма продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения. Во всем мире астмой в настоящее время поражены примерно 300 миллионов человек; ожидается, что к 2020 году астмой будут поражены 400 миллионов человек (Partridge, Eur Resp Rev. 16:67-72, 2007).

[137] Вдыхание аллергена у пациентов с atopической астмой индуцирует некоторые проявления астмы, включая обратимую обструкцию дыхательных путей, гиперреактивность дыхательных путей и эозинофильное и базофильное воспаление дыхательных путей. Провокационная проба с вдыхаемым аллергеном стала преобладающей моделью астмы у многих видов (Bates et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 297(3):L401-10, 2009; Diamant et al., J Allergy Clin Immunol. 132(5):1045-1055, 2013.).

[138] Были выявлены разные подтипы астмы, рефрактерные в отношении лечения стероидами. Эозинофилы являются важными воспалительными клетками при аллергической астме, которая характерным образом опосредуется CD4+ Т-клетками Th2-типа. Нейтрофильное воспаление дыхательных путей ассоциировано с лечением кортикостероидами при тяжелой астме и может быть опосредовано Т-клетками Th1- или Th17-типа (Mishra et al., Dis. Model. Mech. 6:877-888, 2013).

[139] Меры диагностики и оценка астмы включают следующее. Воспаление дыхательных путей оценивали с применением стандартизированного теста для

определения фракции оксида азота в выдыхаемом воздухе при одиночном вдохе (FeNO) (Американское торакальное общество; ATS, *Am J Respir Crit Care Med.* 171(8):912-30, 2005). Спирометрию осуществляют в соответствии с рекомендациями ATS/Европейского респираторного общества (ERS) (Miller et al, *Eur Respir J.* 26(1):153-61, 2005). Спирометрическое тестирование после приема бронходилататора (после BD) оценивали после проведения субъекту спирометрии перед BD. Максимальную бронходилатацию индуцировали с применением SABA, такого как альбутерол (отмеренная доза в 90 мкг) или сальбутамол (отмеренная доза в 100 мкг) или их эквивалент, с помощью спейсерного устройства на максимум 8 полных впрыскиваний (Sorkness et al, *J Appl Physiol.* 104(2):394-403, 2008). Самое высокое значение FEV₁ до и после приема BD, полученное после 4, 6 или 8 впрыскиваний, применяли для определения обратимости и для анализа. Опросник по контролю над астмой (ACQ) 6 представляет собой заполняемый пациентами опросник, оценивающий симптомы астмы (т. е. ночные пробуждения, симптомы при пробуждении, ограничение активности, одышка, хрипы) и ежедневный прием ежедневный прием бронходилататора как средства экстренной терапии и FEV₁ (Juniper et al, Oct 1999). ACQ-6 представляет собой сокращенную версию ACQ, в которой измерение FEV₁ исключено из исходного балла ACQ. Средний балл ACQ представляет собой среднее значение ответов. Средние баллы, равные $\leq 0,75$, указывают на хорошо контролируемую астму, баллы, равные от 0,75 до $\leq 1,5$, указывают на частично контролируемую астму, и балл, равный $> 1,5$, указывает на неконтролируемую астму (Juniper et al, *Respir Med.* 100(4):616-21, 2006). Индивидуальные изменения, составляющие по меньшей мере 0,5, считаются клинически значимыми (Juniper et al, *Respir Med.* 99(5):553-8, 2005). Стандартизированный опросник оценки качества жизни у больных астмой (AQLQ[S])+12 (AQLQ(S)+12) представляет собой опросник из 32 пунктов, с помощью которого измеряется HRQoL, наблюдаемое у пациентов с астмой (Juniper et al, *Chest.* 115(5):1265-70, May 1999). Для оценки также применяется дневник астмы для ежедневного заполнения.

[140] В родственной публикации заявки на патент США US-2018-0296669 (включенной в данный документ посредством ссылки) раскрывается, что лечение с помощью антитела к TSLP является эффективным при ослаблении симптомов астмы в популяции с отсутствием/низким уровнем эозинофилов, как и в популяции с высоким уровнем эозинофилов. Также рассматривается способ снижения частоты обострений астмы у субъекта.

[141] Также в данном документе рассматриваются способы лечения астмы у субъекта, характеризующегося профилем астмы с высоким количеством Th2 или профилем астмы с низким количеством Th2. Предполагается, что антагонист TSLP, который ингибирует связывание белка TSLP с его рецепторным комплексом, будет обеспечивать эффективное лечение популяции с астмой с низким уровнем эозинофилов, как и антитело, описанное в данном документе. Подобным образом предполагается, что антагонист TSLP, который ингибирует связывание TSLP с его рецепторным комплексом, будет эффективным при лечении популяций с астмой с низким количеством Th2. Также

предусматриваются способы лечения хронической обструктивной болезни легких (COPD) у субъекта, включающие введение антитела к TSLP или производного антитела или антигенсвязывающего белка, описанных в данном документе. Предполагается, что субъектом, подлежащим лечению, является человек. Субъект может быть взрослым, подростком или ребенком.

[142] Композиции на основе терапевтического антитела (или производного антитела) могут быть доставлены пациенту в несколько участков. Несколько введений можно проводить одновременно или можно вводить на протяжении определенного периода времени. В определенных случаях благоприятным является обеспечение непрерывного потока терапевтической композиции. Дополнительное средство терапии можно вводить периодически, например, один раз в час, один раз в день, один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, один раз в месяц или с более длительным интервалом.

[143] В различных вариантах осуществления количества терапевтического средства, такого как бивалентное антитело, имеющее два сайта связывания TSLP, в указанной дозировке могут варьироваться в зависимости от габаритов индивидуума, которому вводят средство терапии, а также от характеристик нарушения, подвергаемого лечению.

[144] В иллюстративных вариантах лечения антитело к TSLP или производное антитела вводят в диапазоне доз от приблизительно 70 мг до приблизительно 280 мг на суточную дозу. Например, даваемая доза может составлять приблизительно 70 мг, 210 мг или 280 мг. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела можно вводить в дозе, составляющей 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 или 280 мг на дозу. Эти концентрации можно вводить в виде одной лекарственной формы или в виде нескольких доз. Вышеуказанные дозы вводятся один раз в две недели или один раз в четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела вводят в однократной дозе, составляющей 70 мг, каждые две недели или каждые четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела вводят в однократной дозе, составляющей 210 мг, каждые две недели или каждые четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела вводят в однократной дозе, составляющей 280 мг, каждые две недели или каждые четыре недели.

[145] Для производных антител количество производного антитела должно быть таким, чтобы число сайтов связывания TSLP, которые содержатся в дозе, было эквимольным числу сайтов связывания TSLP с каноническим бивалентным антителом, описанным выше.

[146] Предполагается, что антитело к TSLP или производное антитела вводят каждые 2 недели или каждые 4 недели в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год или больше. В различных вариантах осуществления введение является подкожным или внутривенным.

[147] Предполагается, что лечение с помощью антитела к TSLP или производного антитела уменьшает уровень эозинофилов в крови, мокроте, бронхоальвеолярной жидкости или легких субъекта. Также предполагается, что введение обеспечивает сдвиг количества клеток у субъекта от популяции с высоким количеством Th2 к популяции с низким количеством Th2. Дополнительно предполагается, что введение антитела к TSLP обеспечивает улучшение одного или нескольких показателей астмы у субъекта, выбранных из группы, состоящей из объема форсированного выдоха (FEV), обратимости FEV1, форсированной жизненной емкости легких (FVC), FeNO, балла опросника по контролю над астмой-6 и балла AQLQ(S)+12.

[148] Улучшение течения астмы можно измерить по одному или нескольким из следующего: снижения AER (годовой частоты обострений), снижения количества случаев госпитализации/тяжелых обострений астмы, изменения относительно исходного уровня (увеличения) времени до первого обострения астмы (после начала лечения с помощью антитела к TSLP), уменьшения по сравнению с плацебо доли субъектов с одним или несколькими обострениями или тяжелыми обострениями астмы в ходе лечения, например, в течение 52 недель, изменения относительно исходного уровня (увеличения) FEV1 и FVC (перед приемом бронходилататора и после приема бронходилататора), изменения относительно исходного уровня (уменьшения) количества эозинофилов в крови и мокроте (или легочных эозинофилов, если получены биоптат или жидкость BAL), изменения относительно исходного уровня (уменьшения) FeNO, изменения относительно исходного уровня (уменьшения) IgE, улучшения симптомов и контроля астмы согласно измерению посредством PRO, в том числе ACQ и вариантов, AQLQ и вариантов, SGRQ и дневников симптомов астмы, изменения (уменьшения) приема лекарственных препаратов экстренной терапии, уменьшения приема системных кортикостероидов, уменьшения соотношения клеток Th2/Th1 в крови. Большинство/все из этих измерений следует проводить в общей популяции и субпопуляциях, включая с высоким и низким уровнями эозинофилов (превышающий или равняющийся 250 является высоким; составляющий менее 250 является низким), с аллергическим и неаллергическим заболеванием, с высоким и низким количествами Th2, с высоким и низким уровнями периостина (по сравнению с медианным значением) и с высоким и низким показателями FeNO (превышающим или равняющимся 24 или составляющим менее 24).

[149] В настоящем изобретении также рассматривается введение нескольких средств, таких как композиция на основе антитела в сочетании со вторым средством, описанным в данном документе, включая без ограничения противовоспалительное средство или средство терапии астмы.

[150] Однако предполагается, что в различных вариантах осуществления введение обеспечивает снижение частоты применения или уровней совместно вводимого средства терапии у субъекта. Иллюстративные совместно вводимые средства терапии включают без ограничения ингаляционные кортикостероиды (ICS), β 2-агонисты длительного действия (LABA), антагонисты лейкотриеновых рецепторов [LTRA], антиму斯卡риновые

препараты длительного действия [LAMA], кромоны, β 2-агонисты короткого действия (SABA) и теофиллин или кортикостероиды для перорального применения. В различных вариантах осуществления введение устраняет потребность в терапии с помощью кортикостероидов.

Составы

[151] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении рассматривается применение фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела к TSLP или производного антитела вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта путем введения такой фармацевтической композиции.

[152] В определенных вариантах осуществления приемлемые материалы для составления предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модифицирования, поддержания или сохранения, например, pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные средства; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, сахароза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие

тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[153] Подходящая среда-носитель или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, возможно, дополненные другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляет собой дополнительный пример среды-носителя. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель.

[154] Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для сайта введения. В определенных вариантах осуществления применяют буферы для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком pH, как правило, pH в пределах диапазона от приблизительно 4,5 до приблизительно 8, включая приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4, приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9 и приблизительно 8,0.

[155] В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела находится в составе, содержащем ацетат и одно или несколько из пролина, сахарозы, полисорбата 20 или полисорбата 80. В различных вариантах осуществления состав содержит 5-50 мМ ацетата, 3% (вес./об.) пролина или меньше, 0,015% (вес./об.) \pm 0,005% (вес./об.) полисорбата 20 или полисорбата 80 при значении pH, составляющем от 4,9 до 6,0. Необязательно, антитело или производное антитела находится в концентрации, составляющей от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл. Состав можно хранить при температуре от -20°C до -70°C. Иллюстративные составы на основе антител к TSLP, содержащие эти вспомогательные вещества, описаны в международной заявке № PCT/US2021/018561, включенной в данный документ посредством ссылки.

[156] В альтернативных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела находится в составе, содержащем поверхностно-активное вещество

и по меньшей мере одну основную аминокислоту или ее соль. В иллюстративных случаях основная аминокислота представляет собой аргинин или гистидин. В различных вариантах осуществления соль представляет собой глутамат аргинина или глутамат гистидина необязательно в концентрации, составляющей от 10 мМ до 200 мМ. Необязательно состав дополнительно содержит пролин. В альтернативных вариантах осуществления антитело к TSLP или производное антитела находится в составе, содержащем поверхностно-активное вещество и кальций или его соль. В различных вариантах осуществления соль представляет собой глутамат кальция необязательно в концентрации, составляющей от 15 мМ до приблизительно 150 мМ. Необязательно состав дополнительно содержит пролин. В различных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80 или их смесь. Антитело или производное антитела необязательно находится в концентрации, составляющей более приблизительно 110 мг/мл или более приблизительно 140 мг/мл. Иллюстративные составы на основе антител к TSLP, содержащие эти вспомогательные вещества, описаны в международной заявке на патент № PCT/US2021/017880, включенной в данный документ посредством ссылки.

[157] Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения могут предусматриваться в виде апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемое антитело к TSLP или его производное в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой антитело составляют в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах осуществления получение может предусматривать составление желаемой молекулы со средством, таким как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия увеличения времени пребывания в системном кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть применены для введения антитела. В различных вариантах осуществления введение может осуществляться посредством предварительно заполненного шприца или автоинъектора. В различных вариантах осуществления автоинъектор представляет собой Ypsomed YpsoMate®. В различных вариантах осуществления автоинъектор раскрыт в WO 2018/226565, WO 2019/094138, WO 2019/178151, WO 20120/072577, WO 2020/081479, WO 2020/081480, PCT/US20/70590, PCT/US20/70591, PCT/US20/53180, PCT/US20/53179, PCT/US20/53178 или PCT/US20/53176.

Наборы

[158] В качестве дополнительного аспекта настоящее изобретение включает наборы, которые содержат одно или несколько соединений или композиций, упакованных таким образом, который облегчает их применение для осуществления на практике способов по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления такой набор включает соединение или композицию, описанные в данном документе, упакованные в контейнер, такой как герметично закрытая бутылка или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенной в упаковку, которая описывает применение соединения или композиции при осуществлении способа на практике. Предпочтительно соединение или композиция упакованы в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно включать устройство, подходящее для введения композиции согласно конкретному пути введения или для практического осуществления скринингового анализа. Предпочтительно набор содержит этикетку, описывающую применение композиции на основе антител.

[159] Дополнительные аспекты и подробности настоящего изобретения станут очевидными из следующих примеров, которые, как подразумевается, являются иллюстративными, а не ограничивающими.

Примеры

Пример 1. Выявление признаков тезепелумаба

[160] Тезепелумаб представляет собой полноразмерное человеческое моноклональное антитело подкласса IgG2, вырабатываемое в клетках яичника китайского хомячка (СНО). Он состоит из 2 тяжелых цепей (HC) и 2 легких цепей (LC) подкласса лямбда. Тяжелая и легкая цепи ковалентно связаны дисульфидными связями. Провели биохимическое, биофизическое и биологическое определение характеристик тезепелумаба для обеспечения всестороннего понимания его структурных и функциональных свойств и обеспечения возможности оценки признаков антитела, которые могут оказывать влияние на связывание и активность.

Материалы и способы

[161] *AMG 157 и лабильные остатки, потенциально влияющие на связывание.* Аминокислотная последовательность AMG157 в виде последовательности A5 (и в виде цепей H5, L5), а также некоторых других TSLP-связывающих антител была ранее описана в патенте США 7982016 B2.

[162] Молекулярная масса антитела с гликозилированием A2G0F/A2G0F (C6500 H9998 O2068 N1734 S52) составляет 147189,4 Да, включая N-концевой пироглутамат тяжелой цепи и удаленный C-концевой К. TSLP содержал 74% мономерных, 23% димерных и 3% тетрамерных соединений.

[163] *Пептидное картирование.* Пептидное картирование образцов тезепелумаба осуществляли с применением процедуры подготовки образцов, включающей рефолдинг с помощью гуанидина, восстановление и алкилирование дисульфидных связей, замену буфера и расщепление трипсином на пептиды, подходящие для анализа посредством LC-MS, как описано в (Ren *et al.*, *Anal.Biochem.* 392: 12-21 (2009)). Вкратце, образец,

содержащий тезепелумаб, разбавляли до приблизительно 1 мг/мл в 0,5 мл денатурирующего буфера с pH 7,5 (7,5 М гидрохлорид гуанидина (GdnHCl) и 0,25 М Трис). Восстановление осуществляли путем добавления 3 мкл 0,5 М дитиотреитола (DTT) с последующей 30-минутной инкубацией при комнатной температуре. Карбоксиметилирование достигалось путем добавления 7 мкл 0,5 М йодоуксусной кислоты (IAA). Реакцию проводили в темноте в течение 15 мин. при комнатной температуре. Избыток IAA гасили добавлением 4 мкл 0,5 М DTT. В образцах восстановленного и алкилированного тезепелумаба проводили замену буфера на буфер для расщепления с pH 7,5 (0,1 М Трис или 0,1 М бикарбонат аммония) с применением колонки NAP-5 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси, США). Лиофилизированный трипсин растворяли в воде до конечной концентрации, составляющей 1 мг/мл. Расщепление начинали при добавлении раствора трипсина в концентрации, составляющей 1 мг/мл, к восстановленным, алкилированным и подвергнутым замене буфера образцам тезепелумаба для достижения соотношения фермент/субстрат 1:25. Расщепление проводили при температуре 37°C в течение 30 мин. Конечный гидролизат гасили добавлением 5 мкл 20% FA. Анализ пептидного картирования посредством LC-MS/MS образцов расщепленного тезепелумаба проводили на системе UHPLC Agilent 1290, соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive Biopharma от Thermo Scientific, как описано в (Ren *et al.*, 2009, выше). Полученные необработанные данные LC-MS/MS и последовательности тезепелумаба и мишени применяли для выявления и количественной оценки модификаций с помощью программного обеспечения MassAnalyzer (Zhang, *Anal.Chem.* 81: 8354-8364 (2009)).

[164] *SE-UHPLC*. Образцы тезепелумаба загружали в аналитическую колонку SE-UHPLC (колонка VEN200, размер частиц 1,7 мкм, 4,6 мм × 150 мм, Waters Corporation) и белки разделяли в изократическом режиме с применением подвижной фазы, содержащей 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, при pH 6,8. Мониторинг элюента проводили по поглощению UV при 280 нм. Колонку эксплуатировали при температуре окружающей среды, и подвижную фазу подавали на колонку со скоростью потока, составляющей 0,4 мл/мин.

[165] *RP-HPLC в невосстанавливающих условиях*. Образцы тезепелумаба анализировали посредством RP-HPLC с применением колонки Waters VEN300 C4 (размер частиц 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм) и элюировали с применением подвижной фазы, содержащей 0,1% TFA, в градиенте 1-пропанола при 75°C. Мониторинг поглощения проводили при 215 нм.

[166] *CE-SDS в восстанавливающих условиях*. Образцы тезепелумаба анализировали посредством rCE-SDS. Образцы восстанавливали и подвергали денатурации посредством нагревания в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и β-меркаптоэтанола при pH 6,5 перед электрокинетическим вводом в кварцевый капилляр без покрытия, заполненный буфером для геля с SDS, при 25°C. Мониторинг поглощения проводили при 220 нм.

[167] *CEX-UHPLC*. Образцы лекарственного вещества, представляющего собой тезепелумаб, загружали в аналитическую колонку CEX-HPLC (BioPro SP-F, размер частиц 5 мкм, 4,6 мм × 100 мм, YMC America, Inc.). Подвижная фаза А содержала 20 мМ фосфата натрия при рН 6,6, и подвижная фаза В состояла из 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия при рН 6,6. Белки разделяли с применением линейного градиента концентрации солей, создаваемого с помощью 5-12% подвижной фазы В от 0 мин до 4 мин к 23% подвижной фазе В через 18 мин, к 100% подвижной фазе В от 18,5 мин до 20,5 мин и обратно до 5% подвижной фазы В от 21 мин до 25 мин. Мониторинг элюента проводили по поглощению UV при 280 нм. Колонку эксплуатировали при 28°C, и подвижную фазу подавали на колонку со скоростью потока, составляющей 0,6 мл/мин.

[168] *Картирование гликанов*. Картирование N-гликанов представляет собой аналитическую методику, при которой олигосахариды, присоединенные к остаткам аспарагина, высвобождают посредством ферментативного расщепления. Свободные олигосахариды впоследствии подвергают дериватизации с помощью флуоресцентной метки для обнаружения и количественного определения. Меченые олигосахариды разделяют посредством жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC) с флуоресцентным обнаружением для создания профиля гликанов. В этом способе тезепелумаб подвергают ферментативному расщеплению N-гликозидазой F (PNGase F), которая специфически расщепляет связь между N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) олигосахариды и остатком аспарагина. Высвободившиеся олигосахариды метят 2-аминобензойной кислотой (2-AA) посредством восстановительного аминирования. После стадии очистки центрифугированием олигосахариды разделяют посредством HILIC в системе сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC). Рассчитывают относительные % площадей пиков основных соединений олигосахаридов.

[169] *Активность*. Активность композиций на основе тезепелумаба, обладающих описанными в данном документе признаками, наблюдали с помощью биоанализа связывания рецептор-лиганд и/или клеточного биоанализа с репортерным геном.

[170] Анализ связывания рецептор-лиганд. Данный анализ обеспечивает непосредственное измерение активности тезепелумаба и напрямую отражает молекулярный механизм действия тезепелумаба, который заключается в связывании TSLP и предотвращении его связывания с рецептором TSLP (TSLPR). Данный способ обеспечивает количественное измерение способности тезепелумаба ингибировать связывание TSLP с TSLPR. Тезепелумаб связывается с рекомбинантным лигандом TSLP-His (TSLP-His) и ингибирует его связывание с биотинилированным рецептором TSLP (TSLPR). Анализ активности представляет собой гомогенный анализ усиленной при сближении люминесценции (Alpha) на основе гранул, который позволяет обнаружить биомолекулярные взаимодействия. Анализ включает два типа гранул: акцепторные гранулы и донорные гранулы. Донорные гранулы покрыты гидрогелем, который содержит фталоцианин, фотосенсибилизатор и стрептавидин. Акцепторные гранулы покрыты гидрогелем, который содержит производные тиоксена, а также хелат никеля. Донорные

гранулы связываются с биотинилированным TSLPR посредством взаимодействия между стрептавидином и биотином, и акцепторные гранулы связываются с TSLP, меченным гистицином, вследствие взаимодействия между хелатом никеля и гистицином. Когда TSLP-His и биотинилированный TSLPR связываются друг с другом, акцепторные и донорные гранулы оказываются в непосредственной близости. Когда лазер воздействует на этот комплекс, кислород окружающей среды превращается в синглетный кислород с помощью донорных гранул. Если гранулы находятся в непосредственной близости, то происходит передача энергии на акцепторные гранулы, что приводит в результате к выработке люминесценции, которую измеряют на устройстве для считывания планшетов, оснащённом функцией обнаружения сигнала AlphaScreen®. Тезепелумаб связывается с TSLP-His и предотвращает его связывание с биотинилированным TSLPR, тем самым уменьшая выход люминесценции дозозависимым образом. Активность тестируемого образца определяют путем сравнения ответа тестируемого образца с ответом, полученным для эталонного стандарта. Следует понимать, что анализ связывания рецептор-лиганд, описанный в этом параграфе, является подходящим анализом для определения способности композиции ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле.

[171] Клеточный биоанализ с репортерным геном. Связывание белка тимусного стромального лимфопоэтина человека (TSLP) с комплексом рецептора TSLP человека (TSLPR), экспрессируемого на поверхности стабильных мышечных клеток BaF, индуцирует активацию Stat 5 и пролиферацию клеток. В этом способе используется мышечная линия клеток BaF/hu HTR, которая совместно трансфицирована плазмидами, кодирующими репортерный ген люциферазы Stat и ген устойчивости к бластицидину. Когда клетки Stat/BaF/HTR инкубируют с рекомбинантным человеческим TSLP, после связывания с TSLPR происходит передача сигнала, что приводит к увеличению активности люциферазы. AMG 157 противодействует активности TSLPR, индуцированной TSLP, тем самым ингибируя TSLP-опосредованный ответ люциферазы. В этом способе измеряется дозозависимый ингибирующий эффект эталонного стандарта AMG 157 и тестируемых образцов в отношении клеток Stat/BaF/HTR, стимулированных с помощью TSLP. После инкубации с TSLP и тезепелумабом клетки обрабатывают реагентом, содержащим детергент (для лизиса клеток) и люциферин, субстрат люциферазы. Реакция люциферазы с люциферином приводит к люминесценции, которую измеряют люминометром. Выработку люциферазы в репортерных клетках в ответ на стимуляцию TSLP количественно оценивают по показаниям люминесценции после добавления субстрата люциферазы. Степень ингибирования TSLP-индуцированной активации репортерной активности люциферазы пропорциональна количеству тезепелумаба. Биологическую активность тестируемого образца определяют путем сравнения ответа тестируемого образца с эталонным стандартом. Следует понимать, что клеточный анализ с репортерным геном, описанный в этом параграфе, является

подходящим анализом для определения способности композиции ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

Результаты

[172] Биохимическое определение характеристик тезепелумаба выявила модифицированные антитела, представляющие собой тезепелумаб, которые можно было выделить из препаратов на основе тезепелумаба и после хранения лекарственного вещества, включая изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, высокомолекулярные соединения, фрагментированные соединения, частично восстановленные соединения, производные с гликанами с высоким содержанием маннозы или производные, представляющие собой дисульфидные изоформы. Эти признаки оценивали на предмет их потенциального влияния на активность и переносимость тезепелумаба.

[173] **Изомеризация.** Изомеризацию аспарагиновой кислоты оценивали путем пептидного картирования в восстанавливающих условиях посредством LC-MS/MS. Остатки аспарагиновой кислоты, как нативные, так и образовавшиеся в результате дезамидирования Asn, могут подвергаться изомеризации через промежуточный продукт, представляющий собой циклический имид. Изомеризация может влиять на связывание мишени и эффективность в зависимости от близости модифицированного остатка к CDR. Нативные уровни изомеризации тезепелумаба оценивали посредством масс-спектрометрического анализа исследований пептидного картирования. Изомеризацию в положении Asp⁵⁴ CDR2 HC и Asp^{91/95} CDR3 LC в лекарственном веществе на значительном уровне не наблюдали. Исследования принудительного разложения при термическом воздействии показали, что Asp^{49/50} CDR2 LC чувствителен к изомеризации при повышенных температурах. Кроме того, уровни изомеризации Asp⁵⁴ CDR2 HC также показали незначительное увеличение (< 2%) при повышенной температуре. Таким образом, преобладающие сайты изомеризации были выявлены как Asp^{49/50} CDR LC и Asp⁵⁴ CDR HC на уровне 10% и 2% через 5 недель принудительного термического разложения (40°C).

[174] Изомеризацию Asp^{49/50} в CDR2 легкой цепи наблюдали в лекарственном веществе на уровне примерно 0,2%. Изомеризацию в положении Asp⁵⁴ CDR2 HC и Asp^{91/95} CDR3 LC в лекарственном веществе на значительном уровне не наблюдали.

[175] Мониторинг партий продукта, применяемых в клинических испытаниях в конце срока годности, проводили на предмет уровней примесей, таких как HMW соединения, фрагменты, изомеризация и т. д., и сравнивали с примесями при первоначальном выпуске той же партии. Увеличение содержания примесей с течением времени позволяет рассчитать клиническое воздействие уровней примесей на субъекта, и определить эффекты этих признаков на безопасность продукта, и обеспечивает меру переносимости примесей в лекарственном веществе. Например, в клиническом

исследовании тезепелумаба использовалось лекарственное вещество, которое вводили до последнего месяца из его 36-месячного клинического срока годности. Применение длительно хранящегося лекарственного продукта в сочетании с введением более высоких доз и более частым введением доз подвергало пациентов воздействию более высоких уровней веществ, связанных с продуктом, и примесей, связанных с продуктом, чем при использовании новых партий лекарственного продукта. Повышенное воздействие было обусловлено, главным образом, увеличением введения кумулятивных доз за месяц лечения (например, посредством подкожной инъекции 420 мг Q14D) по сравнению с дозой, составляющей 210 мг, которую вводили подкожно ежемесячно.

[176] Введение клинических доз, составляющих 420 мг, каждые две недели при подкожной инъекции примерно в 4 раза превышает ежемесячную дозу, составляющую 210 мг. На основе этой схемы введения доз было подсчитано, что системное воздействие при режиме введения более высокой дозы, выраженное либо "площадью под кривой" (AUC), либо максимальной концентрацией в сыворотке крови (C_{max}), в 3,2-3,7 раза выше соответственно, чем при более низкой клинической дозе. Согласно протоколу клинического исследования тестирование антител будет осуществляться только в случае неожиданного изменения воздействия или событий безопасности, потенциально связанных с антителами к лекарственному средству. Эти результаты не наблюдали, и лекарственное средство переносилось хорошо.

[177] На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в данном клиническом испытании оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании, и оценивали переносимость. Например, % признака в лекарственном продукте (например, НWM) можно умножить на множители клинического воздействия, чтобы определить эквивалентные уровни % признака в партии продукта, вводимой в предлагаемой дозе, составляющей 210 мг, Q28D.

[178] Что касается изомеризации, расчетная общая изомеризация не более 30%, исходя из дозы, составляющей 210 мг, Q28D, не была ассоциирована с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*. Расчетная изомеризация D49/D50 или D52 на уровне 26% на основе дозы, составляющей 210 мг, Q28D не была ассоциирована с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*, при этом расчетная изомеризация D54 на уровне 4% на основе дозы, составляющей 210 мг, Q28D не была ассоциирована с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*.

[179] **Окисление.** Окисление оценивали с применением триптической пептидной карты в восстанавливающих условиях согласно LC-MS. Окисление по остатку метионина (Met) представляет собой посттрансляционную модификацию, которая потенциально может возникнуть в результате воздействия кислорода и/или химических окислителей, а также фотовоздействия. Тезепелумаб содержит по 8 остатков Met в каждой тяжелой цепи (Met², Met³⁴, Met⁸³, Met¹¹⁷, Met²⁵³, Met³⁵⁹, Met³⁹⁸, Met⁴²⁹). В легкой цепи остатков Met нет. Только один остаток Met, Met³⁴, расположен в определяющей комплементарности области (CDR). Низкие, но обнаруживаемые уровни окисления наблюдали по остаткам Met²,

Met¹¹⁷, Met²⁵³, Met³⁵⁹, Met³⁹⁸ тяжелой цепи (таблица 1). Окисление метионина в CDR может потенциально влиять на активность, однако окисление в положении Met³⁴ из области CDR не наблюдали. Степень окисления оценивали по пептидной карте в восстанавливающих условиях с масс-спектрометрическим детектированием (ESI-MS). Для расчета относительного процентного значения применяли вывод об относительной интенсивности окисленных и неокисленных соединений; однако этот подход считается полуколичественным вследствие потенциальных различий в значениях эффективности ионизации и совместного элюирования мешающих соединений. Анализ тезепелумаба в условиях принудительного окисления применяли для выяснения восприимчивости определенных сайтов молекулы к окислению.

Таблица 1. Уровни окисления метионина в лекарственном веществе тезепелумаба

Остаток	Окисление	Петля (элемент)
Met ²	~1%	V _H (Fab)
Met ¹¹⁷	~1%	CH ₁ (Fab)
Met ²⁵³	~2%	CH ₂ (Fc)
Met ³⁵⁹	~3%	CH ₂ (Fc)
Met ³⁹⁸	~1%	CH ₃ (Fc)
Met ⁴²⁹	<1%	CH ₃ (Fc)

[180] Принудительное химическое окисление показало, что порядок чувствительности к метионину тяжелой цепи соответствует Met¹¹⁷>Met²⁵³>Met²>Met⁴²⁹, указывая на то, что Met¹¹⁷ и Met²⁵³ представляют собой сайты с наибольшим воздействием растворителя. Сходным образом с исследованиями химического окисления, описанными выше, исследования фотодегградации установили значения относительной чувствительности остатков Met тяжелой цепи к светоиндуцированному окислению следующим образом: Met²⁵³>Met¹¹⁷>Met³⁹⁸>Met³⁵⁹. Уровень окисления Met³⁴ ниже уровня количественного определения, и учитывая последовательность и фолдинг молекулы, можно предположить, что этот остаток недоступен для окисления. Кроме того, исследования фотодегградации показали увеличение уровней окисления остатков триптофана в порядке Trp¹⁰²>Trp⁵⁶>Trp⁵²>Trp⁹⁰, что указывает на то, что Trp¹⁰² варибельной области тяжелой цепи и Trp⁵⁶ легкой цепи являются сайтами с наибольшим воздействием света (таблица 2).

Таблица 2. Уровни окисления триптофана в лекарственном веществе тезепелумаба

Остаток	Окисление	Петля (элемент)
Trp ⁵⁶	<1%	V _L (Fab)
Trp ¹⁰²	<1%	V _H (Fab, CDR3)
Trp ¹⁵⁰	<1%	CH ₁ (Fab)

Trp ²⁷⁸	~2%	CH ₂ (Fc)
--------------------	-----	----------------------

[181] Наблюдаемое окисление в конце срока годности EOS (максимальное значение 36 месяцев при 2-8°C плюс 2 месяца при 30°C) показало окисление в HCDR в положении W52 примерно на уровне 0,2% и окисление в положении W102 на уровне 1,1%. Окисление лекарственного вещества обнаружено в виде 0,3-0,5% окисленного W102. На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетное окисление W102 на уровне, составляющем не более 6-7%, на основе дозы, составляющей 210 мг, Q28D не было ассоциировано с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*. Окисление триптофана может происходить при повышенной температуре и при экстремальном воздействии видимого и UV-света. Окисление триптофана в CDR, вызванное экстремальными условиями, ассоциировано с умеренным снижением активности. Существует сильная корреляция между окислением триптофана и показателем желтизны.

[182] **Дезамидирование.** Дезамидирование аспарагина оценивали с применением триптического пептидного картирования с помощью LC-MS. Нативные уровни дезамидирования в тезепелумабе оценивали посредством анализа ESI-MS/MS исследований пептидного картирования. Лишь низкие уровни дезамидирования наблюдались по остаткам Asn³¹⁶ и Asn³⁸⁵ тяжелой цепи (таблица 3). В лекарственном веществе не наблюдалось дезамидирование по другим сайтам, включая Asn⁵⁷ и Asn^{25/26} в CDR2 тяжелой цепи и CDR1 легкой цепи соответственно.

Таблица 3. Уровни дезамидирования аспарагина в лекарственном веществе тезепелумаба

Остаток	Дезамидирование	Петля (элемент)
Asn ³¹⁶	< 1%	CH ₂ (Fc)
Asn ³⁸⁵	2%	CH ₃ (Fc)

[183] Анализ тезепелумаба в условиях принудительного дезамидирования применяли для оценки восприимчивости конкретных сайтов молекулы к дезамидированию. При физиологическом значении pH 7,4 в качестве наиболее восприимчивых участков были определены Asn³⁹⁰ и Asn³⁸⁵ (лекарственное вещество 3%; EOS, 5%), тогда как второстепенный участок выявляли в положении Asn³¹⁶ (лекарственное вещество 0,09-0,1%; EOS, 0,4%), все они расположены в Fc-области. Дезамидирование в CDR вариабельной области LC в положении Asn²⁵ наблюдали только на низком уровне (лекарственное вещество, 0,1-0,2%; EOS, 0,4%). На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетное дезамидирование в положении Asn²⁵ на уровне не более 2% (на основе дозы, составляющей 210 мг, Q28D) не было ассоциировано с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*, и расчетное

дезамидирование в положении Asn385/390 на уровне не более 13% (на основе дозы, составляющей 210 мг, Q28D) не было ассоциировано с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*.

[184] **Гликозилирование.** Гликозилирование имеет отношение к эффекторной функции антитела и связыванию антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток, и измененное гликозилирование может мешать одной или нескольким из этих функций. Эффекторная функция включает антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP).

[185] На основании наличия консенсусной последовательности, а также ретроспективного определения характеристик моноклональных антител IgG2, полученных из культуры клеток млекопитающих, ожидается, что тезепелумаб будет содержать единственный сайт N-гликозилирования в положении Asn²⁹⁸ на каждой тяжелой цепи. Сайты гликозилирования оценивали путем сравнения триптических пептидных карт с обработкой PNGазой F и без нее. PNGаза F расщепляет гликановые структурные единицы с высоким содержанием маннозы, гибридные и сложные гликановые структурные единицы между остатком восстанавливающего конца N-ацетилглюкозамина в гликане и остатком Asn пептидного остова. Составы соединений на карте N-связанных гликанов определяли путем подключения выхода при хроматографическом разделении к масс-спектрометру Orbitrap.

[186] Всестороннее определение характеристик гликанового дополнения тезепелумаба демонстрирует наличие биантенарных N-связанных структур с варьирующей степенью галактозилирования концов в качестве преобладающих соединений и высоких уровней (примерно 95%) фукозилирования. Распределение гликанов каждого лекарственного вещества в СЕХ, определенное посредством HILIC, показано в таблице 4.

Таблица 4. Площадь пика гликанов в % лекарственного вещества (DS) тезепелумаба

Образец	Фукозилированный (%)	С высоким содержанием маннозы (%)	β-Галактозилированный (%)	Сиалилированный (%)
DS	93,8	3,9	22,8	0,1

[187] Популяция производных тезепелумаба с гликанами содержит галактозилированные соединения (DS 19,9-28,6%), афукозилированные соединения (DS 1,1-1,2%) и 3,9-4,8% соединений с высоким содержанием маннозы в DS (преимущественно в виде олигоманнозы 5). На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетные афукозилированные соединения на уровне не более примерно 5%, расчетные галактозилированные соединения на уровне не более 75-90% и расчетные

производные с высоким содержанием маннозы на уровне не более 14-18% не были ассоциированы с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*, все оценки основаны на дозе, составляющей 210 мг, Q28D.

[188] Чтобы исследовать биологический эффект удаления N-связанного гликана тезепелумаб обрабатывали с помощью PNGазы F, очищали и тестировали с помощью анализа связывания рецептор-лиганд и клеточного биоанализа с репортерным геном (таблица 5). Эти результаты показывают, что удаление N-гликанов не влияет на тезепелумаб ни в одном из анализов активности.

Таблица 5. Биологическая активность дегликозилированного тезепелумаба

Условие оценки	Анализ связывания рецептор-лиганд	Клеточный биоанализ с репортерным геном
	% Относительной активности*	% Относительной активности*
Дегликозилированный	112	98

*Среднее значение для 3 повторностей.

[189] Уровни гликанов с высоким содержанием маннозы потенциально могут влиять на период полужизни продукта, и условия технологического процесса в производственном биореакторе могут влиять на уровни фрагментов с высоким содержанием маннозы. Влияние параметров технологического процесса производственного биореактора на структурные единицы с высоким содержанием маннозы оценивали в исследованиях по характеристике процесса, при этом рН определили как основной параметр процесса, влияющий на структурные единицы с высоким содержанием маннозы. Установили приемлемый диапазон значений рН для поддержания стабильных уровней структурных единиц с высоким содержанием маннозы. Уровни структурных единиц с высоким содержанием маннозы в исследованиях по характеристике процесса составляли $\leq 7,5\%$.

Пример 2. Производные по размеру

[190] Помимо химических изменений тезепелумаба на аминокислотном уровне также возможны производные, содержащие агрегаты или фрагменты.

[191] Общая ожидаемая масса пептидного остова интактного тезепелумаба, предполагающая наличие 2 немодифицированных легких цепей, 2 N-концевых пироглутамидированных тяжелых цепей и 18 дисульфидов связей, составляет 144298 Да. Кроме того, нативный тезепелумаб содержит единственный сайт N-связанного гликозилирования в положении Asn²⁹⁸ на каждой из двух тяжелых цепей. Теоретическая масса интактного гликозилированного тезепелумаба с 2 копиями гликана на Asn²⁹⁸, 2 копиями преобладающего C-концевого Gly-производного, тяжелой цепи и 2 копиями преобладающего N-концевого пироглутамина тяжелой цепи составляет 147189 Да. Обработка интактного тезепелумаба с помощью PNGазы F обеспечивает удаление N-гликозилирования с сопутствующим увеличением массы полипептида на 1 Да на цепь

вследствие превращения несущего гликан Asn в остаток Asp и обеспечивает снижение гетерогенности деконволюционного масс-спектра. Теоретическая масса дегликозилированного материала составляет 144300 Да.

[192] Гетерогенность по размеру является внутренним свойством белков, обусловленным действием химического или ферментативного расщепления, а также самоассоциацией посредством различных механизмов. Потенциальные производные по размеру могут включать: высокомолекулярные (HMW) соединения за счет самоассоциации с образованием соединений, более крупных, чем мономер (димер, олигомерные соединения более высокого порядка). HMW могут быть образованы посредством нековалентной ассоциации, восстанавливаемой ковалентной ассоциации и/или невосстанавливаемой ковалентной ассоциации; низкомолекулярные (LMW) соединения за счет усечения полипептидного остова и/или неполной сборки составляющих субъединицы (т. е. легкой цепи и тяжелой цепи).

[193] Гетерогенность по размеру тезепелумаба оценивали с применением следующих аналитических способов: эксклюзионная сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография (SE-UHPLC) для оценки размера и чистоты в нативных условиях; ультрацентрифугирование со скоростной седиментацией (SV-AUC) и SE-HPLC с детектированием статического светорассеяния (SLS) для обеспечения дополнительной оценки молярной массы; капиллярный электрофорез в восстанавливающих условиях с додецилсульфатом натрия (rCE-SDS) для определения размера и чистоты в восстанавливающих и денатурирующих условиях. Разделенные производные включают фрагменты, фрагменты с невосстанавливаемыми ковалентными связями, полипептиды, лишенные нормального гликозилирования или содержащие дополнительные сайты гликозилирования; капиллярный электрофорез в невосстанавливающих условиях с додецилсульфатом натрия (nrCE-SDS) для определения размера и чистоты в денатурирующих условиях. Разделенные производные предусматривают частично собранные молекулы, фрагменты, ковалентные связи.

[194] Результаты этих аналитических методик показали, что лекарственное вещество тезепелумаба преимущественно состоит из мономера с низкими уровнями димеров и LMW соединениями на основании результатов SE-UHPLC, SE-HPLC-SLS и аналитического ультрацентрифугирования со скоростной седиментацией (SV-AUC). Низкие уровни LMW соединений наблюдаются в денатурирующих условиях (nrCE-SDS), а также в восстанавливающих и денатурирующих условиях (rCE-SDS). На основании результатов rCE-SDS тезепелумаб восстанавливается преимущественно до компонентов HC и LC с небольшими уровнями фрагментированных и HMW соединений. К ним относятся LMW соединения (меньше, чем LC), со средней молекулярной массой (MMW, меньше, чем HC, но больше, чем LC) и HMW соединения (больше, чем HC). LMW соединения (например, менее 25 кДа) и MMW соединения (приблизительно от 25 кДа до 50 кДа) обнаруживали в совокупности в виде фрагментов и наблюдали в менее 2% препаратов на основе тезепелумаба [DS: < 0,4% (98,7-99% для HC+LC); EOS: 1,5% (97,3-

97,5% для HC+LC)].

[195] Мониторинг гетерогенности тезепелумаба по размеру проводят посредством SE-UHPLC в неденатурирующих условиях, которая представляет собой способ внутрипроизводственного контроля и часть программы выпуска и тестирования стабильности лекарственного вещества и лекарственного продукта. Способ осуществляют в неденатурирующих условиях для отделения пика НМВ соединений от основного пика мономера. Лекарственное вещество тезепелумаба анализировали посредством SE- UHPLC на колонке Waters ВЕН200, 4,6×150 мм с размером частиц 1,7 мм в подвижной фазе 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, рН 6,8, при скорости потока, составляющей 0,4 мл/мин, и детектировании с поглощением при 280 нм. В профиле преобладает наличие основного пика (относительная площадь в процентах 99,6%), элюируемого примерно через 2,8 минуты. Второстепенный пик, лучше всего наблюдаемый на хроматограмме, увеличенной в 20 раз, элюируется раньше основного пика при времени удерживания примерно 2,2 минуты. Этот пик содержит НМВ тезепелумаб и характеризуется процентом относительной площади 0,4%, как показано в таблице 6.

Таблица 6. Процент площади пика лекарственного вещества тезепелумаба согласно SE-UHPLC

Идентификация пика	% относительной площади
Основной пик	99,6
НМВ	0,4

[196] В целом НМВ соединения обнаруживали в лекарственном веществе (DS) на уровне примерно 0,3-0,6%, но в EOS на уровне 1,7%, например, $\leq 1,4\%$ НМВ (высвобождение) и $\leq 1,7$ НМВ (стабильность). На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетные НМВ соединения на уровне не более 20% НМВ (на основе дозы, составляющей 210 мг Q28D) не были ассоциированы с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*.

[197] rCE-SDS применяли для оценки тяжелой цепи и легкой цепи, а также LMW и MMW соединений. Электрофореграмма rCE-SDS для тезепелумаба представлена в виде значений % площади пика, показанных в таблице 7. Эти данные демонстрируют, что тезепелумаб состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, соединенных дисульфидной связью. В лекарственном веществе тезепелумаба второстепенные пики, наблюдаемые в областях LMW и MMW, находятся в пределах шума базовой линии и вариабельности способа. В соответствии с результатами SE-UHPLC почти не наблюдают LMW или MMW соединения. На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетные

разновидности, представляющие собой фрагменты, на уровне не более 15% на основе дозы, составляющей 210 мг Q28D, не были ассоциированы с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*.

Таблица 7. Процент площади пика лекарственного вещества тезепелумаба согласно rCE-SDS

Идентификация пика	% относительной площади
LC+ HC	98,7
LMW	< LOQ*
MMW	< LOQ*
NGHC	0,6
HMW	0,4

*LOQ=0,3%

[198] CE-SDS также можно осуществлять в невосстанавливающих условиях, чтобы оценить наличие немономерных соединений. Эта методика осуществляется в денатурирующих условиях для развертывания белка и разрушения нековалентных ассоциаций и особенно применима для обнаружения соединений, представляющих собой неполные молекулы, и частично восстановленных интактных молекул, т. е. молекул, в которых отсутствует одно или несколько составляющих 2 легких цепей и 2 тяжелых цепей или соответствующие межцепочечные связи, ожидаемые для мономерного антитела. Сообщалось о соединениях, состоящих из 2 тяжелых цепей, ассоциированных с единственной легкой цепью (HHL), или из единственной тяжелой цепи, ассоциированной с единственной легкой цепью (HL, также известной как полумолекула), в определенных условиях культивирования клеток (Trexler-Schmidt M, et al., 2010). Тезепелумаб подвергали денатурации посредством нагревания в присутствии SDS и N-этилмалеимида при pH 6,5 перед электрокинетическим вводом в капилляр из плавленого кварца без покрытия (внутренний диаметр 50 мкм x 30,2 см), заполненный буфером для геля с SDS, при 25°C. Напряжение в момент ввода составляло 10,0 кВ, напряжение при разделении составляло 15,0 кВ и мониторинг поглощения проводили при 220 нм. Данные демонстрируют, что лекарственное вещество тезепелумаба преимущественно состоит из мономера тяжелой цепи и легкой цепи, соединенных дисульфидными связями, с низкими уровнями соединений с меньшим молекулярным весом, составляющими менее 4,5% распределения (таблица 8).

Таблица 8. Процент площади пика лекарственного вещества тезепелумаба согласно nrCE-SDS

Идентификация пика	% относительной площади
Основной пик, мономер HC+LC	95,5
Препики, соединения с меньшим	4,5

молекулярным весом

[199] Добавление детектирования на основе статического светорассеяния (SLS) к способу SE-HPLC позволяет определять молярную массу отдельных пиков на хроматограмме. Интенсивность света, рассеянного элюирующимися соединениями, пропорциональна как концентрации, так и молекулярному весу соединений. Интенсивность поглощения UV (280 нм) пропорциональна концентрации белка. Молярную массу каждого элюирующегося соединения можно определить с помощью программного обеспечения производителя прибора, используя интенсивность светорассеяния и концентрацию для каждого пика. Лекарственное вещество тезепелумаба анализировали хроматографическим методом SE-HPLC в сочетании с детектированием на основе многоугольного светорассеяния в режиме реального времени с применением системы HPLC Agilent 1100 с колонкой TSK-GEL G3000SWxl, размер частиц 5 мкм, внутренний диаметр 7,8 мм x длина 300 мм. В качестве детекторов применяли детектор Wyatt Heleos II, детектор Wyatt Optilab TrEX RI и детектор Agilent UV с длиной волны, установленной на 280 нм. Хроматографирование согласно SE-HPLC осуществляли при комнатной температуре с применением в качестве подвижной фазы буфера на основе 100 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, pH 6,8±0,1 и со скоростью потока 0,5 мл/мин.

[200] UV-профиль и соответствующие значения молярной массы, рассчитанные на основе данных SLS, полученных для лекарственного вещества тезепелумаба, показывают, что молярная масса основного пика составляет 145 кДа, что близко соответствует теоретической массе мономера тезепелумаба (147 кДа). Молярная масса пика, элюируемого до мономера, в среднем составляет 284 кДа, что близко соответствует теоретической массе димера тезепелумаба (294 кДа), указывая на то, что большинство HMW соединений являются димерами тезепелумаба (таблица 9).

Таблица 9. Молекулярная масса основного пика и пика основного HMW соединения лекарственного вещества тезепелумаба, определенная посредством SE-HPLC-SLS

Идентификация пика	Молекулярная масса (кДа) ^a
Мономер	145 ± 0,2
Димер (HMW)	284 ± 6

[201] Обогащенную HMW фракцию (обогащенную димером тезепелумаба) и основной пик (содержащий главным образом мономер) оценивали на активность посредством анализа связывания рецептор-лиганд и клеточного биоанализа с репортерным геном. Результаты показывают снижение активности, определенное посредством анализа связывания рецептор-лиганд и клеточного биоанализа с репортерным геном, на 64% и 62% активности тезепелумаба соответственно (таблица 10).

Таблица 10. Определение активности фракций SE-UHPLC

Описание образца	Анализ связывания	Клеточный биоанализ с
------------------	-------------------	-----------------------

	рецептор-лиганд % относительной активности	репортерным геном % относительной активности
HMW	64	62
Основной пик	108	96

[202] Этот результат ожидаем, поскольку самоассоциация накладывает стерические ограничения и может привести к конформационным изменениям, которые, в свою очередь, могут оказать влияние на связывание. Увеличенная скорость образования агрегатов может иметь место при повышенной температуре, низком рН, физиологическом рН, воздействии видимого и UV-света. При определении биологических характеристик установлено, что HMW соединения обладают пониженной активностью. Снижение активности *in vitro* можно было обнаружить только тогда, когда они достигали уровней, значительно превышающих количества, обнаруженные при нормальных условиях обработки и хранения.

[203] **Дисульфидные изоформы.** Тезепелумаб представляет собой антитело подкласса IgG2, и поэтому ожидается, что он будет проявлять опосредованные дисульфидными связями структурные производные и изоформы (Wypych *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23):16194-16205, 2008; Dillon *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23):16206-16215, 2008). Структурная гетерогенность, обусловленная дисульфидными связями, присуща рекомбинантным и встречающимся в природе молекулам IgG2, которые содержат 18 дисульфидных связей, 6 межцепочечных и 12 внутрицепочечных (Wang *et al.*, 2007; Zhang and Czupryn, 2002). Соединение дисульфидных связей, обнаруженных в тезепелумабе, выявляли с применением разных подходов в зависимости от числа связей, присутствующих в невосстановленных пептидах. Для пептидов, содержащих одну дисульфидную связь, для оценки соединения посредством дисульфидной связи применяли сравнение триптических пептидных карт в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

[204] В отличие от классической структуры IgG2-A изоформа IgG2-B содержит симметричные связи, соединяющие две копии пептидов Fab (C_H1-C_L-шарнир) с двумя копиями шарнирного пептида. IgG2-A/B представляет собой промежуточную форму, объединяющую частичные свойства как IgG2-A, так и IgG2-B, определяемые асимметричным строением, включающим одно плечо Fab, ковалентно связанное с двумя копиями шарнирного пептида через дисульфидные связи (Wypych *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23):16194-16205, 2008; Dillon *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23):16206-16215, 2008; Zhang *et al.*, Anal Chem., Vol. 82(3):1090-1099, 2010).

[205] Пептиды, соединенные дисульфидными связями, выявляли в нефракционированном лекарственном веществе посредством пептидного картирования с применением эндопротеазы трипсина в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Выход разделения посредством RP-HPLC сочетали с масс-спектрометром с

ионизацией электрораспылением (ESI-MS) для масс-анализа в дополнение к UV-детекции. Невосстановленный продукт расщепления впоследствии обрабатывали восстанавливающим агентом [гидрохлоридом трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP)] и повторно анализировали с применением тех же условий. Каждый пептид, соединенный дисульфидными связями, из триптической пептидной карты лекарственного вещества тезепелумаба в невосстанавливающих условиях анализировали на составляющие пептиды посредством масс-спектрометрии в восстанавливающих условиях. В совокупности определение характеристик пептидов, соединенных дисульфидными связями, обозначенных от А до Н, выявило связи между конкретными остатками Cys, обобщенными в таблице 11, которые подтверждают наличие классической дисульфидной структуры IgG2-A.

Таблица 11. Подтвержденное соединение IgG2-A для пептидов от А до Н

Пептид, соединенный дисульфидными связями	Составляющие пептиды	Выявленные связи Cys-Cys (пептиды)	Петля (элемент)
А	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) - Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
В	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) - Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
С	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) - Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
Д	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) - Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
Е	(H14)/(L15)	Cys ¹³⁶ (H14) - Cys ²¹³ (L15)	Соединение HC-LC
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) - Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
G	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) - Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
Н	(H20)/(H20)	Cys ²²⁴ (H20) - Cys ²²⁴ (H20)	Шарнир
		Cys ²²⁵ (H20) - Cys ²²⁵ (H20)	
		Cys ²²⁸ (H20) - Cys ²²⁸ (H20)	
		Cys ²³¹ (H20) - Cys ²³¹ (H20)	

[206] Триптические пептидные карты в невосстанавливающих условиях также показали наличие производного IgG2-B. Дополнительное подтверждение дисульфидного производного IgG2-B выполняли посредством RP-HPLC в невосстанавливающих условиях. В совокупности определение характеристик соединенных дисульфидными связями пептидов от А до D, пептидов от F до G, а также пептида I выявило связи между конкретными остатками Cys, обобщенными в таблице 12, которые подтверждают наличие структуры, представляющей собой дисульфидную изоформу IgG2-B.

Таблица 12. Подтвержденное соединение IgG2-B для пептидов от А до D, от F до G и I

Пептид,	Составляющие	Выявленные связи Cys-Cys	Петля (элемент)
---------	--------------	--------------------------	-----------------

соединенный дисульфидными связями	пептиды	(пептиды)	
A	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) - Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
B	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) - Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
C	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) - Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
D	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) - Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) - Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
G	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) - Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
I	(H20)/(L15)	Cys ²²⁴ (H20) - Cys ²¹³ (L15)	Форма IgG2-B
	(H14)/(H20)	Cys ¹³⁶ (H14) - Cys ²²⁵ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²²⁸ (H20) - Cys ²²⁸ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²³¹ (H20) - Cys ²³¹ (H20)	

[207] Присутствие структурной изоформы IgG2-A/B также обнаруживали в триптических пептидных картах тезепелумаба в невозстанавливающих условиях. Дополнительное подтверждение производного, представляющего собой дисульфидную изоформу IgG2-A/B, выполняют посредством RP-HPLC в невозстанавливающих условиях. В совокупности определение характеристик соединенных дисульфидными связями пептидов от A до G и пептида J выявило связи между конкретными остатками Cys, обобщенными в таблице 13, подтверждая наличие структуры, представляющей собой дисульфидную изоформу IgG2-A/B.

Таблица 13. Подтвержденное соединение IgG2-A/B для пептидов от A до G и J

Пептид, соединенный дисульфидными связями	Составляющие пептиды	Выявленные связи Cys-Cys (пептиды)	Петля (элемент)
A	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) - Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
B	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) - Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
C	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) - Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
D	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) - Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
E	(H14)/(L15)	Cys ¹³⁶ (H14) - Cys ²¹³ (L15)	Соединение HC-LC
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) - Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
G	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) - Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
J	(H14)/(H20)	Cys ¹³⁶ (H14) - Cys ²²⁴ (H20)	Форма IgG2-A/B
	(H20)/(L15)	Cys ²²⁴ (H20) - Cys ²¹³ (L15)	
	(H20)/(H20)	Cys ²²⁵ (H20) - Cys ²²⁵ (H20)	

	(H20)/(H20)	Cys ²²⁸ (H20) - Cys ²²⁸ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²³¹ (H20) - Cys ²³¹ (H20)	

[208] Сравнение триптического пептидного картирования в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях позволило выявить присутствие ожидаемых пептидов, соединенных дисульфидными связями, для преобладающей структуры IgG2-A, а также пептидов, несущих соединение, связанное с дополнительными дисульфидными структурными изоформами IgG2-A/B и IgG2-B. Относительный уровень дисульфидных изоформ в тезепелумабе колеблется в диапазоне примерно 3,4-4,2% IgG2-B, 39,2-42% IgG2-A/B и 54,2-57,1% IgG2-A по данным RP-HPLC. На основании дозировки и предполагаемых уровней признаков во время введения в клиническом испытании с участием людей оценивали уровни воздействия признаков на пациентов, участвовавших в клиническом испытании. Расчетные производные, представляющие собой дисульфидные изоформы IgG2-B, на уровне не более 15% на основе дозы, составляющей 210 мг Q28D, и расчетные производные, представляющие собой дисульфидные изоформы IgG2-A/B, на уровне не более 75% на основе дозы, составляющей 210 мг Q28D, не были ассоциированы с какими-либо проблемами по безопасности *in vivo*. Активность дисульфидных изоформ оценивали путем обогащения лекарственного вещества основными изоформами IgG2-A, IgG2-A/B и IgG2-B с применением СЕХ-UHPLC. Результаты продемонстрировали, что в рамках возможностей анализа все изоформы показали полную активность.

Пример 3. Анализ соотношения влияния признаков и активности

[209] Статистический анализ с использованием модели регрессии наименьших квадратов осуществляли для оценки взаимосвязи между HMW соединениями, isoAsp CDR по D49, D50 и общим окислением CDR. Анализ был основан на этих признаках, определенных по результатам анализа принудительного разложения, описанного в примере 1.

[210] Анализ осуществляли с измерениями активности с применением клеточного биоанализа с репортерным геном, описанного в данном документе (фигуры 1A - C), а также с измерениями активности с применением анализа связывания рецептор-лиганд, описанного в данном документе (фигуры 1D - F). Выявленные взаимосвязи между признаками были сопоставимы для обоих анализов активности. Выявили статистически значимые отрицательные корреляции между HMW соединениями и общим окислением trp CDR (фигуры 1B - C и 1E - F). Взаимосвязи между IsoAsp D49, D50 CDR и активностью не достигли статистической значимости.

Пример 4. Соединения с высоким содержанием маннозы и фармакокинетическое (PK) моделирование

[211] Для оценки потенциального влияния увеличения % соединений с высоким содержанием маннозы (НМ) на клиренс тезепелумаба применяли подход моделирования. Модель предполагала период полужизни, составляющий 24,5 дня (PK-профиль после внутривенных доз тезепелумаба в клиническом исследовании), и увеличенную константу скорости, составляющую 0,035, дня⁻¹ для формы НМ тезепелумаба на основе скорости

уменьшения НМ% эталонного моноклонального антитела IgG2 после однократной внутривенной дозы. Увеличенная константа скорости формы НМ эталонного моноклонального антитела IgG2 имеет самое высокое значение, проанализированное на сегодняшний день, и ее выбирали в качестве консервативной оценки периода полужизни тезепелумаба НМ. PK-профиль моделировали до 122,5 дня (эквивалент 5 периодов полужизни) и не применяли поправку на предпочтительное образование пар. Как показано в **таблице 14** ниже, моделировали взаимосвязь между уровнями НМ и предполагаемым увеличением клиренса тезепелумаба.

Таблица 14. Уровни соединений с высоким содержанием маннозы и предполагаемое влияние на клиренс

Уровни НМ	Предполагаемое увеличение клиренса
5%	Не применимо
8%	1,7%
11%	3,3%
13%	4,4%
15%	5,5%
18%	7,2%
21%	9,4%
23,1%	10,0%

[212] Эти результаты указывают на то, что композиция на основе тезепелумаба, содержащая 5% или меньше соединений НМ, практически не демонстрировала увеличения клиренса, и примерно 23% соединений НМ в композиции на основе тезепелумаба обеспечивали увеличение клиренса антитела на примерно 10%.

[213] Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Следует понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретными описанными методологией, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, необходимо понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

[214] Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают изомеризованное производное, и где количество изомеризованного производного в композиции составляет менее приблизительно 30%, где тезепелумаб содержит

А) переменный домен легкой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и

(B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

2. Композиция по п. 1, где количество изомеризованного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 13%.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, где изомеризованное производное предусматривает модификацию в определяющей комплементарности области (CDR) тяжелой цепи или легкой цепи.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где изомеризованное производное предусматривает изменение D54 CDR тяжелой цепи в SEQ ID NO: 7 и/или D49, D50 или D52 CDR легкой цепи в SEQ ID NO: 4 в переменной области либо одной, либо обеих цепей.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по D54 в SEQ ID NO: 7 в количестве, составляющем менее приблизительно 5%.

6. Композиция по любому из пп. 1-4, где изомеризованное производное предусматривает изомеризацию по одному или нескольким из D49, D50 или D52 в SEQ ID NO: 4 в количестве, составляющем менее приблизительно 13%.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, где изомеризованное производное представляет собой изоаспарагиновую кислоту (isoAsp) или циклический аспартат (cAsp).

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где количество изомеризованного производного в композиции определено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 30% изомеризованного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген

люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

10. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают дезамидированное производное, и где количество дезамидированного производного в композиции составляет менее приблизительно 15%, где тезепелумаб содержит

А) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и

(B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

11. Композиция по п. 10, где количество дезамидированного производного в композиции составляет от приблизительно 0,5% до 10%.

12. Композиция по п. 10 или п. 11, где дезамидированное производное содержит дезамидированный аспарагин N25/N26 в SEQ ID NO: 3, N316 в SEQ ID NO: 13 и/или N385/390 в SEQ ID NO: 13.

13. Композиция по любому из пп. 10-12, где дезамидированное производное предусматривает дезамидирование по N25/N26 в SEQ ID NO: 3 в количестве, составляющем менее приблизительно 3%.

14. Композиция по любому из пп. 10-12, где дезамидированное производное предусматривает дезамидирование по одному или нескольким из N316 и/или N385/390 в SEQ ID NO: 13 в количестве, составляющем менее приблизительно 13%.

15. Композиция по любому из пп. 10-14, где количество дезамидированного производного в композиции определено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

16. Композиция по любому из пп. 10-15, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% дезамидированного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

17. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают окисленное производное, и где количество окисленного производного в композиции составляет менее приблизительно 7%, где тезепелумаб содержит

А) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;
 - (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и
 - (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и
- (B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;
- (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и
- (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

18. Композиция по п. 17, где количество окисленного производного в композиции составляет от приблизительно 0,4% до приблизительно 7%.

19. Композиция по п. 17 или п. 18, где окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из метионина M34 тяжелой цепи в SEQ ID NO: 6, M253, M359 в SEQ ID NO: 13 или триптофана W52 тяжелой цепи в SEQ ID NO: 7, W90 в SEQ ID NO: 5 или W102 в SEQ ID NO: 8 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях.

20. Композиция по любому из пп. 17-19, где окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из метионина M34 тяжелой цепи в SEQ ID NO: 6, M253, M359 в SEQ ID NO: 13 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 7%.

21. Композиция по любому из пп. 17-19, где окисленное производное предусматривает окисление по одному или нескольким из триптофана W52 в SEQ ID NO: 7, W90 в SEQ ID NO: 5 или W102 в SEQ ID NO: 8 в любой из тяжелых цепей или обеих тяжелых цепях, где необязательно окисление происходит в количестве, составляющем менее приблизительно 3%.

22. Композиция по любому из пп. 17-21, где количество окисленного производного в композиции определено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

23. Композиция по любому из пп. 17-22, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 7% окисленного производного, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

24. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба представляют собой высокомолекулярные (HMW) соединения, и где количество HMW соединений в композиции составляет менее приблизительно 20%, где тезепелумаб содержит

- A) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;
 - (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и
 - (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и
- (B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;
- (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и
- (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

25. Композиция по п. 24, где количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 1,7% или меньше.

26. Композиция по п. 24 или п. 25, где количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 1,4% или меньше.

27. Композиция по любому из пп. 24-26, где HMW соединения предусматривают димер тезепелумаба.

28. Композиция по любому из пп. 24-27, где количество HMW соединений в композиции определено посредством эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC).

29. Композиция по п. 28, где SE-HPLC представляет собой SE-ультра-HPLC, где белки разделяются в изократическом режиме с применением подвижной фазы, содержащей 100 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, при значении pH, составляющем 6,8.

30. Композиция по любому из пп. 24-29, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 20% HMW соединений, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

31. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают фрагмент тезепелумаба, и где количество фрагмента тезепелумаба в композиции составляет менее приблизительно 15%, где тезепелумаб содержит

(A) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;
 - (ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и
 - (iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и
- (B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

- (i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;
- (ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и
- (iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

32. Композиция по п. 31, где фрагменты тезепелумаба представляют собой низкомолекулярные (LMW) или среднемолекулярные (МММ) соединения или их комбинации.

33. Композиция по п. 31 или п. 32, где фрагменты представляют собой низкомолекулярные соединения с весом, составляющим менее приблизительно 25 кДа.

34. Композиция по п. 31 или п. 32, где фрагменты представляют собой среднемолекулярные соединения, характеризующиеся молекулярным весом, составляющим от приблизительно 25 кДа до 50 кДа.

35. Композиция по любому из пп. 31-34, где количество фрагмента тезепелумаба в композиции определено посредством капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS).

36. Композиция по любому из пп. 31-35, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 15% фрагментов тезепелумаба, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR.

37. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где одно или несколько производных тезепелумаба предусматривают гликозилированное производное, и где количество гликозилированного производного в композиции составляет менее приблизительно 40%, где тезепелумаб содержит

(A) переменный домен легкой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и

(B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

38. Композиция по п. 37, где количество гликозилированного производного в композиции составляет менее приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10% или приблизительно 5%.

39. Композиция по п. 37 или п. 38, где гликозилированное производное предусматривает изменение гликозилирования тезепелумаба по остатку N298 в SEQ ID NO: 13 в одной или обеих тяжелых цепях.

40. Композиция по любому из пп. 37-39, где гликозилированное производное предусматривает афукозилирование или изменение гликозилирования тезепелумаба до

структурных единиц с высоким содержанием маннозы или галактозильных структурных единиц.

41. Композиция по любому из пп. 37-40, где гликозилированное производное содержит афукозилированные производные в количестве, составляющем менее приблизительно 5%.

42. Композиция по любому из пп. 37-40, где гликозилированное производное содержит галактозильные структурные единицы в количестве, составляющем менее приблизительно 30%.

43. Композиция по любому из пп. 37-40, где гликозилированное производное содержит структурные единицы с высоким содержанием маннозы в количестве, составляющем менее приблизительно 5%.

44. Композиция по любому из пп. 37-40 или п. 43, где тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более приблизительно 25%, приблизительно 23%, приблизительно 21%, приблизительно 19%, приблизительно 17%, приблизительно 15%, приблизительно 13%, приблизительно 11%, приблизительно 8% или приблизительно 5% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы.

45. Композиция по любому из пп. 37-40, п. 43 или п. 43А, где тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются меньшим клиренсом и/или более длительным периодом полужизни, чем композиция, содержащая более 25% гликозилированных производных с высоким содержанием маннозы.

46. Композиция по любому из пп. 37-45, где количество гликозилированного производного в композиции определено посредством способа на основе карты гликанов.

47. Композиция по любому из пп. 37-46, где

(а) тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR, или

(b) тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более 15% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом, чем композиция, содержащая более 15% структурных единиц с высоким содержанием маннозы.

48. Композиция по любому из пп. 37-46, где

(а) тезепелумаб и производные тезепелумаба характеризуются большей активностью и/или переносимостью, чем композиция, содержащая более 40% гликозилированных производных, где указанная активность предусматривает способность ингибировать связывание биотинилированного TSLPR, иммобилизованного на донорной

грануле, с TSLP-His, иммобилизованным на акцепторной грануле, или способность ингибировать связывание TSLPR, экспрессируемого на поверхности клетки Stat/BaF/HTR, кодирующей репортерный ген люциферазы Stat, экспрессия которого указывает на связывание TSLP с TSLPR, или

(b) тезепелумаб и производные тезепелумаба содержат не более 25% структурных единиц с высоким содержанием маннозы и характеризуются меньшим клиренсом, чем композиция, содержащая более 25% структурных единиц с высоким содержанием маннозы.

49. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько его производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, где одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-B и/или изоформу IgG2-A/B, и где количество производного, представляющего собой дисульфидную изоформу, в композиции составляет менее приблизительно 75%.

50. Композиция по п. 49, где одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-B, и где количество дисульфидного производного в композиции составляет менее приблизительно 20%.

51. Композиция по п. 50, где количество изоформы IgG2-B составляет менее приблизительно 5%.

52. Композиция по п. 49, где одно или несколько производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, предусматривают изоформу IgG2-A/B.

53. Композиция по п. 52, где количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет менее приблизительно 75%.

54. Композиция по п. 52, где количество изоформы IgG2-A/B в композиции составляет от приблизительно 38% до приблизительно 43%.

55. Композиция по любому из пп. 48-54, где количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции определено посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях.

56. Композиция, содержащая тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба, где производные тезепелумаба предусматривают изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, гликозилированные производные, НМВ соединения, фрагменты, производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, или их комбинации, где композиция обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

(a) количество изомеризованных производных в композиции составляет приблизительно 30% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях;

(b) количество дезамидированных производных в композиции составляет приблизительно 15% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования;

(c) количество окисленных производных в композиции составляет приблизительно

7% или меньше, как измерено посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях;

(d) количество гликозилированных производных в композиции составляет приблизительно 40% или меньше, как измерено посредством картирования гликанов;

(e) количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, в композиции составляет приблизительно 75% или меньше, как измерено посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях;

(f) количество HMW соединений в композиции составляет приблизительно 20% или меньше, как измерено посредством SE-HPLC, и/или

(g) количество фрагментов в композиции составляет приблизительно 15% или меньше, как измерено посредством rCE-SDS.

57. Композиция по любому из пп. 49-56, где тезепелумаб содержит

(A) переменный домен легкой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 3;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 4, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 5, и

(B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6;

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, и

(iii) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8.

58. Композиция по любому из пп. 1-57, где тезепелумаб содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 12.

59. Фармацевтический состав, содержащий композицию по любому из пп. 1-58 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

60. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-58 или фармацевтического состава по п. 59.

61. Способ по п. 60, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, atopического дерматита, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig_g, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF).

62. Способ по п. 60 или п. 61, включающий введение композиции с интервалом каждые 2 недели или каждые 4 недели.

63. Способ по любому из пп. 60-62, где композицию вводят в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год или больше.

64. Способ по любому из пп. 60-63, где астма представляет собой тяжелую астму.

65. Способ по любому из пп. 60-64, где астма представляет собой эозинофильную или незозинофильную астму.

66. Способ по любому из пп. 60-65, где введение осуществляют посредством предварительно заполненного шприца или автоинъектора.

67. Способ по п. 66, где автоинъектор представляет собой устройство Ypsomed YpsoMate®.

68. Композиция на основе тезепелумаба по любому из пп. 1-58 или фармацевтическая композиция по п. 59 для применения в лечении воспалительного заболевания у субъекта.

69. Композиция по п. 68, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF).

70. Применение композиции на основе тезепелумаба по любому из пп. 1-58 или фармацевтической композиции по п. 59 в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания у субъекта.

71. Композиция или применение по любому из пп. 68-70, где введение осуществляют посредством предварительно заполненного шприца или автоинъектора.

72. Композиция или применение по п. 71, где автоинъектор представляет собой устройство Ypsomed YpsoMate®.

73. Композиция или применение по любому из пп. 68-72, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF).

74. Способ оценки качества композиции на основе тезепелумаба, включающий получение композиции на основе тезепелумаба, которая содержит тезепелумаб и одно или несколько производных тезепелумаба;

измерение количества одного или нескольких производных тезепелумаба в композиции, где производные тезепелумаба предусматривают изомеризованные производные, дезамидированные производные, окисленные производные, гликозилированные производные, производные, представляющие собой дисульфидные изоформы, НМВ соединения, фрагменты или их комбинации;

сравнение измеренного количества одного или нескольких производных тезепелумаба с предварительно определенным эталонным критерием и

получение фармацевтического состава или фармацевтического продукта из композиции на основе тезепелумаба, если сравнение указывает на то, что предварительно

определенный эталонный критерий удовлетворяется.

75. Способ по п. 74, где измеряют количество изомеризованных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 30% или меньше.

76. Способ по п. 74 или п. 75, где величину изомеризации в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

77. Способ по п. 74, где измеряют количество дезамидированных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 15% или меньше.

78. Способ по п. 74 или п. 77, где величину дезамидирования в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

79. Способ по п. 74, где измеряют количество окисленных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 7% или меньше.

80. Способ по п. 74 или п. 79, где величину окисления в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством пептидного картирования в восстанавливающих условиях.

81. Способ по п. 74, где измеряют количество гликозилированных производных, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 40% или меньше.

82. Способ по п. 74 или п. 81, где величину гликозилирования в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством картирования гликанов.

83. Способ по п. 74, где измеряют количество производных, представляющих собой дисульфидные изоформы, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 75% или меньше.

84. Способ по п. 74 или п. 83, где количество дисульфидных изоформ в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) в невосстанавливающих условиях.

85. Способ по п. 74, где измеряют количество HMW соединений, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 20% или меньше.

86. Способ по п. 74 или п. 85, где количество HMW соединений измеряют посредством SE-HPLC.

87. Способ по п. 74, где измеряют количество фрагментов, и предварительно определенный эталонный критерий составляет приблизительно 15% или меньше.

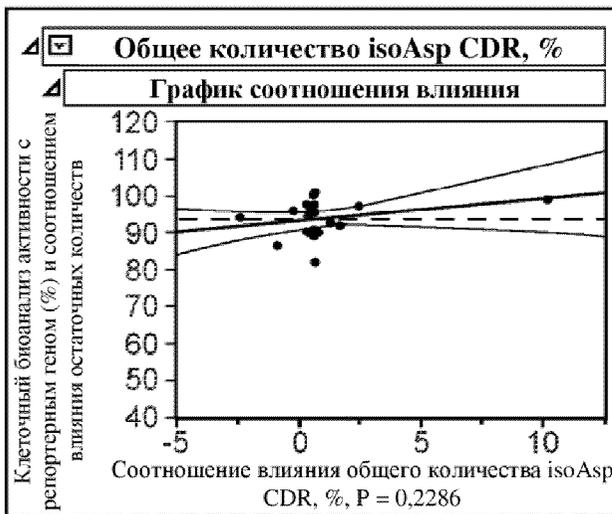
88. Способ по п. 74 или п. 87, где количество фрагментов в композиции на основе тезепелумаба измеряют посредством rCE-SDS.

89. Способ по любому из пп. 74-88, где композицию на основе тезепелумаба получают из линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), которая экспрессирует

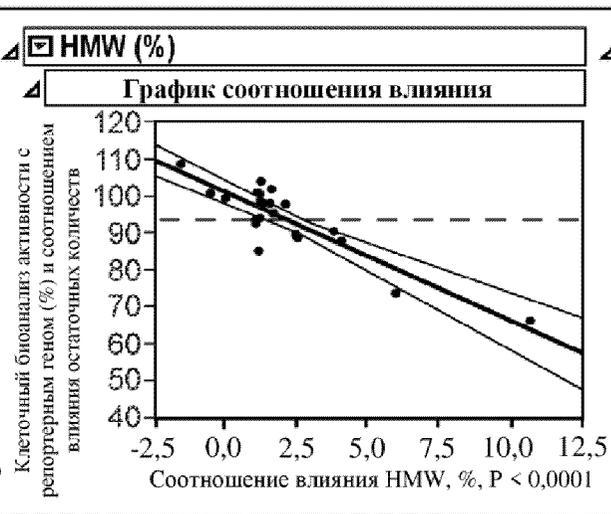
нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь под SEQ ID NO: 10, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь под SEQ ID NO: 12.

По доверенности

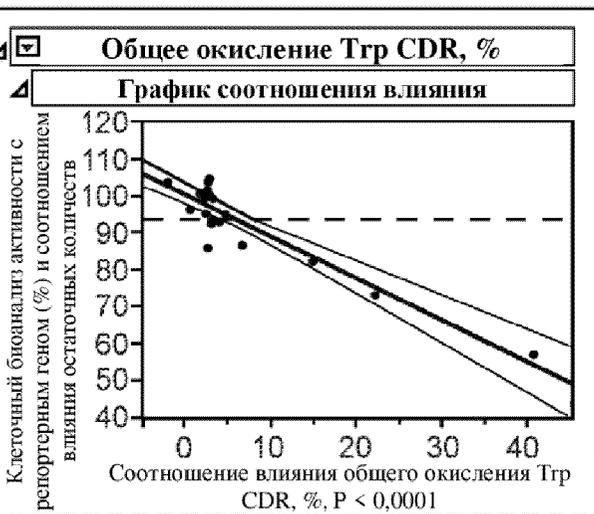
Фигура 1А



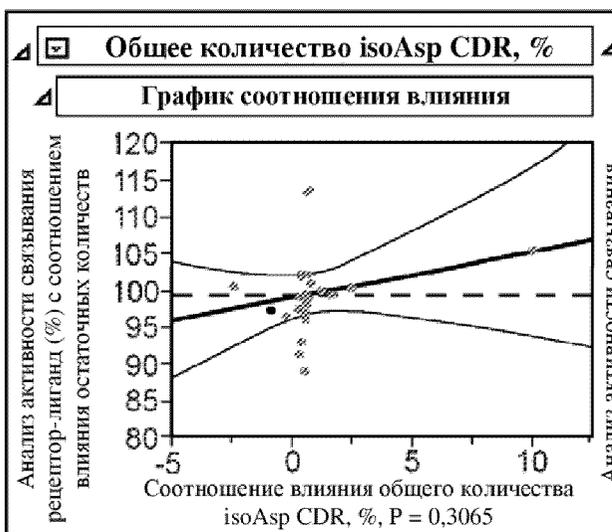
Фигура 1В



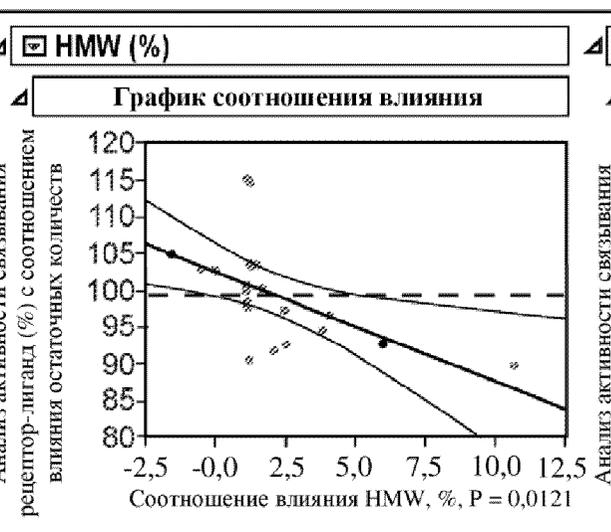
Фигура 1С



Фигура 1D



Фигура 1Е



Фигура 1F

